

**ZUR ROLLE VON FERRITIN
BEI DER EISENRESORPTION -**

**Tierexperimentelle Untersuchungen an Ratten
mit verschiedenen Eisenderivaten**

CYRUS EHTECHAMI

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554619_0048

ZUR ROLLE VON FERRITIN BEI DER EISENRESORPTION -

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN AN RATTEN

MIT VERSCHIEDENEN EISENDERIVATEN

Dissertation der Fakultät
für
Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Cyrus Ehtechami
aus Teheran

München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Forth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reimann
Tag der mündlichen Prüfung: 20.2.1987
Die Dissertation wurde am 19.12.1986 der
Fakultät zur Beurteilung eingereicht.

Meiner Mutter in Dankbarkeit

ABKÜRZUNGEN

Ag	Antigen
AK	Antikörper
BSA	bovine serum albumin/Rinderserumalbumin
c	Konzentration
Ci	Curie
cpm	counts per minute/Impulse pro Minute
D	Dalton
E	Extinktion
Fe-PM	Eisenpolymaltosekomplex
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	hours/Stunden
IgG	Immunglobuline der Gammafraktion
M	Molarität
MG	Molekulargewicht
n	Versuchszahl
N	Normalität
PBS	phosphate buffered saline/phosphatgepufferte Saline
r	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskonstante
s	Standardabweichung
SEM	standard error of means/Standardfehler des Mittelwertes
SDS	sodium dodecyl sulfate/Natriumlaurylsulfat
TEA	Triethanolamin
t	Zeit
V _e	Elutionsvolumen
V _o	Ausschlußvolumen
V _t	Gesamtvolumen
$\bar{x}$	arithmetisches Mittel

Die vorliegende Arbeit wurde am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Forth (Vorstand des Walther-Straub-Instituts) durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. W. Forth danke ich für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Ratschläge und anregenden Diskussionen, sowie für die Durchsicht meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. Reimann danke ich für die wohlwollende Unterstützung und für sein Interesse, wodurch es mir ermöglicht wurde, diese Arbeit am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie durchzuführen.

Herrn Dr. rer. nat. B. Elsenhans danke ich besonders für sein Interesse an der Problemstellung der Arbeit, für seine kritischen Anmerkungen und nützlichen Diskussionen, sowie bei der Abfassung der Arbeit.

Frl. Oehlmann und Frl. Spindler danke ich für die Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Aufgabenstellung	7
C. Ergebnisse	8
C.1. Identifizierung des Ferritins	8
C.1.1. Gelchromatographie	8
C.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	9
C.1.3. Aminosäureanalyse	12
C.2. Voraussetzungen und Vorarbeiten für die quantitative Bestimmung des Ferritins	13
C.2.1. Mengenabgleich von Ferritin aus verschiedenen Präparationen im Laurell-Assay	15
C.2.2. Radioaktive Markierung von Ferritin	18
C.2.3. Erstellung des Radioimmunoassays	21
C.3. Überprüfung der ^{59}Fe -Häm-Ausschüttelmethode mit HCl als Dissoziationsmittel	25
C.4. Ergebnisse der Tierversuche	27
C.4.1. Gewebeferritinbestimmungen	28
C.4.1.1. Gehalt an Leber- und Mukosaferritin	28
C.4.2. Plasmaferritinbestimmungen	30
C.4.3. Kinetik der Retention von Eisen aus verschiedenen ^{59}Fe -Derivaten nach oraler Gabe	31

	Seite
C.4.4.	Zusammenhang zwischen max. Plasmaeisenanstieg und 0,5 h Eisenresorption 33
C.4.5.1.	^{59}Fe -Aufnahme in die Duodenalmukosa normaler und eisenarmer Ratten 34
C.4.5.2.	Spezifischer ^{59}Fe -Einbau in duodenales Mukosa- ferritin eisenarmer und normaler Ratten 36
C.4.6.1.	Aufnahme von ^{59}Fe in die Leber normaler und eisenarmer Ratten 37
C.4.6.2.	Spezifischer Einbau von ^{59}Fe in das Leberferritin normaler und eisenarmer Ratten 39
C.4.7.	Zeitlicher Verlauf der ^{59}Fe -Verteilung im Vollblut normaler und eisenarmer Ratten 40
D.	Experimenteller Teil 43
D.1.	Präparation von Ferritin 43
D.1.1.	Homogenisierung und Hitzedenaturierung 44
D.1.2.	Ammoniumsulfatfällung 44
D.1.3.	Gelchromatographie von Rattenleberferritin 45
D.1.4.	Polyacrylamid-Gelelektrophoresen 46
D.1.5.	Präparative Isoelektrische Fokussierung 48
D.2.	Bestimmung des Hämoglobingehaltes und des Hämatokritwertes 49
D.2.1.	Hämoglobingehalt 49
D.2.2.	Bestimmung des Hämatokritwertes 49
D.3.	Bestimmung von Eisen im Serum und der Eisen- bindungskapazität 50
D.4.	Immunchemische Verfahren 50

	Seite
D.4.1.	Immunblot 50
D.4.2.	Doppeldiffusionstests 50
D.4.3.	Immunelektrophoresen 52
D.4.4.	Nachbehandlung der Präzipitate von Doppeldiffusions- tests und Immunelektrophoresen 54
D.5.	Isolierung von IgG aus Kaninchen Antiseren 54
D.5.a.	Ammoniumsulfatfällung 54
D.5.b.	Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose CL-4B 54
D.6.	Radiochemische Verfahren 55
D.6.1.	Iodierung von Ferritin 55
D.6.2.	Markierung von IgG 56
D.6.3.	Bestimmung der ins Protein eingebauten Radioaktivität 57
D.6.4.	Bestimmung der immunologischen Reaktivität der Elutionsfraktionen 57
D.6.5.	Analytische Disk-Gelelektrophorese der markierten Proteine 57
D.6.6.	Quantitativer Präzipitationstest zur Ermittlung des optimalen Anti-IgG/IgG Verhältnisses 58
D.6.7.	Radioimmunoassay von Ferritin 58
D.6.7.1.	Bestimmung der optimalen Anti-Ferritin Menge für den RIA 58
D.6.7.2.	Erstellung der Standardkurve des RIA's 59
D.7.	Gewinnung und Aufarbeitung von Mukosa- und Leber- homogenaten 60
D.8.	Bestimmung des ^{59}Fe -Einbaus in Gewebeferritin 62
D.9.	^{59}Fe -Eiseneinbau in Hämoglobin 65

	Seite
D.10.	Tierexperimente 65
D.10.1	Antikörpergewinnung 65
D.10.2.	Tiere für Eisenresorptionsexperimente 66
D.10.3.	Erzeugung von Eisenmangel bei Ratten 67
D.10.4.	Messung der ^{59}Fe -Retention nach oraler Verabreichung der Eisenpräparate 67
E.	Diskussion 70
E.1.	Plasma- und Gewebeferritingehalte 70
E.2.	Kinetik der ^{59}Fe -Aufnahme und Bioverfügbarkeit von zwei- und dreiwertigen ^{59}Fe -Derivaten 75
E.3.	^{59}Fe -Utilisation in roten Blutzellen und ^{59}Fe -Hämsyn- these 79
E.4.	^{59}Fe -Einbau in Leberferritin als Parameter für die Bioverfügbarkeit von Eisenderivaten 79
E.5.	Zusammenhang zwischen Eisenresorption und duodenalem Mukosaferritin 81
E.6.	Bedeutung des Mukosaferritins und dessen Beladung für die intestinale Eisenresorption 83
E.7.	Rechnerische Auswertung der Meßdaten 85
F.	Zusammenfassung 86
G.	Literaturverzeichnis
II.	Tabellenanhang
I.	Lebenslauf

A. EINLEITUNG

Die ausgeglichene Eisenbilanz im Organismus wird im wesentlichen durch die Steuerung der Resorption aufrecht erhalten (60), da ein Regelmechanismus für die Ausscheidung fehlt. Die tägliche Eisenausscheidung ist im Normalzustand gering (61). Zum Ausgleich solcher Verluste steht dem Organismus nur die Resorption des Eisens aus der Nahrung zur Verfügung. Ist der Bedarf groß, wie in Zeiten des Wachstums, in der Schwangerschaft, oder infolge von Blutverlusten, bei der Frau z.B. nach der Menstruation, steigt die intestinale Resorption von Eisen an. Ist der Bedarf klein, sinkt die Eisenresorption auf minimale Werte ab (62, 63).

Normalerweise deckt die Resorption Eisenverluste des Organismus, wobei beim Menschen die tägliche Bilanz von Verlust und Ersatz durch Resorption rund 1 mg Eisen beträgt (62).

Die höchste resorptive Aktivität wird in oberen Dünndarmschnitten des Duodenums und Jejunums beobachtet. Hier existiert ein System, das für die Adaptation der Resorption von Eisen an den Bedarf des Organismus verantwortlich ist (62). Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, daß nach Verabfolgung von Eisen mit der Schlundsonde die Aufnahme in den Organismus mit einer Sättigungskinetik erfolgt (80).

Neben der Tatsache, daß die Resorption von Eisen an einen intakten Stoffwechsel der Mukosazelle geknüpft ist (64), sprechen im wesentlichen folgende Argumente für die Existenz eines Transportsystems:

1. Die Kapazität der Resorption ist limitiert (65).
2. Der Transport von Eisen verläuft gerichtet, von der Mukosa- zur Serosaseite (66, 67).
3. Das Transportsystem zeigt eine hohe Spezifität für

Eisen. Es reagiert zwar auch mit anderen Metallen, die dem Eisen chemisch nahestehen, wie Kobalt und Nickel, sowie mit Mangan, Zink, Cadmium, Chrom und Plutonium (96); die Spezifität für Eisen ist jedoch am deutlichsten ausgeprägt (62, 68).

Aus den Eigenschaften des Transportsystems war zu schließen, daß es Bestandteile enthalten muß, die mit Eisenionen reversibel Verbindungen eingehen. Im Gegensatz zu den Alkalimetallen, sind Eisen und andere Schwermetalle unter biologischen Bedingungen im ionisierten Zustand nicht frei löslich. Während die Alkalimetalle Natrium und Kalium im Plasma fast völlig dissoziiert sind, können Schwermetalle wie Eisen, Kupfer und Zink frei, als undissoziierte Kationen, kaum existieren.

Der grundlegende Unterschied zwischen Eisen und den Alkalimetallen liegt darin, daß Eisen bei physiologischer Wasserstoffionenkonzentration Koordinationsbindungen eingeht. Dieser Unterschied, daß das Eisenion nicht frei, undissoziiert, sondern als Koordinationsverbindung vorliegt, ist ein bestimmender Faktor sowohl für die intraluminale Bioverfügbarkeit des Eisens für die Resorption, als auch für den Transferprozeß durch die Mukosazelle. Beim Studium der Bestandteile des Transportsystems zogen vor allem Proteine die Aufmerksamkeit auf sich, dafür sind folgende Gründe verantwortlich:

1. Inhibitoren der Proteinsynthese wie Cycloheximid und Tetracycline hemmen die Eisenresorption (69, 70, 71).
2. Die Resorption von Eisen ist mit Phenobarbital, einem Induktor arzneistoffabbauender Enzyme, induzierbar (72).

Aus dem Mukosahomogenat von Duodenum und oberem Jejunum wurden eine Reihe eisenbindender Proteine isoliert, die sowohl im Cytosol frei gelöst sind, als auch an Membranen gebunden sein

können (3, 74, 122, 123).

Nach Auftrennung cytosolischer eisenbindender Proteine per Gelfiltration, bzw. durch Elektrophorese, konnten Ferritin und Transferrin identifiziert werden (73, 74).

Die Untersuchung des Eisenresorptionsmechanismus stützte sich anfangs auf die von Hahn et al (75) und Granick (76) aufgestellten Mukosablock-Theorie, in der Granick Ferritin für den Eisen-Akzeptor hielt. Später wurden diese Vorstellungen modifiziert (106, 107), da sich herausstellte, daß trotz Absättigung der Mukosazelle Eisen resorbiert wird. Außerdem ist wohl bekannt, daß der Organismus nicht gegen eine Eisenvergiftung geschützt ist (108). Allenfalls könnte aus der Theorie von Hahn geschlossen werden, daß der Organismus den Bedarf an Eisen reguliert.

Die Funktion eines Speicherproteins, das den Eisenbedarf des Organismus für die Hämoglobinsynthese oder anderer eisenbindender Proteine reguliert, wird besonders deutlich, wenn man das Fehlen eines Eisenexkretionsmechanismus betrachtet.

Ferritin erfüllt diesen Anspruch durch folgende drei Punkte:

1. Es hat eine große Kapazität für Eisen (bis zu 4500 Fe-Atome pro Molekül).
2. Es hat eine Depotkapazität für Eisen (ca. 2/3 der Moleküle sind mit Eisen gefüllt).
3. Es hat die Fähigkeit Eisen aufzunehmen und, wenn auch langsam, wieder abzugeben.

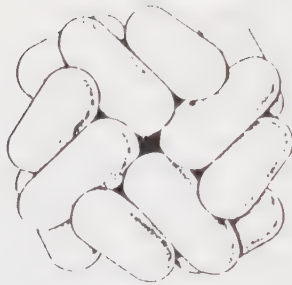


Abb. 1

Molekül von Apoferritin. Das Molekül besteht aus 24 Untereinheiten, nach Banyard et al (124).

Die Proteinhülle von Ferritin ist aus 24 symetrischen Untereinheiten aufgebaut. Diese wiederum setzen sich aus schweren (H=heavy subunit ca. 21 000 D) und leichten (L=light subunit ca. 18 000 D) Untereinheiten zusammen (48, 49, 81). Ferritin ist ein globuläres Protein (Abb. 1), wobei der innere Durchmesser der Proteinhülle 70 - 80 Å, der äußere 120 - 130 Å beträgt.

Die Eiseneinlagerung und Freigabe erfolgt durch 6 Kanäle, die ca. 10 Å groß sind. Jede Untereinheit ist aus 4 langen α -Helices (35 - 42 Å) und einer kurzen Helix aufgebaut. Die kompakte Struktur des Proteins mag eine mögliche Erklärung für die ungewöhnliche Hitze-stabilität sein.

Wie schon erwähnt, hat die Proteinhülle Platz für maximal 4500 Fe-Atome, die als Eisenoxyhydroxide gelagert werden. Bei vollständiger Beladung des Proteins kann das Molekulargewicht von 450 000 D (Apoferritin) auf 900 000 D ansteigen. Gewebeferritine sind nur teilweise mit Eisen beladen, woraus die unterschiedlichen Sedimentationskonstanten (17 S für Apoferritin, 24 S für Holo ferritin) zu erklären sind (82). Die regulative Rolle des mukosalen Ferritins für die Eisenresorption (75, 76) wurde durch folgende Befunde in Frage gestellt:

1. Nach intraluminaler Gabe von Eisen wird Apoferritin sowohl in der Mukosa eisenarmer Tiere, als auch in der Mukosa normaler Tiere synthetisiert (77). Für den raschen Eisentransport, wie er gerade bei eisenarmen Tieren beobachtet wird, scheint Ferritin infolge der langsamen Freisetzung des Eisens (78, 79) ungeeignet.
2. Eine gesicherte Beurteilung der Rolle von Ferritin setzte die Kenntnis der quantitativen Verhältnisse von individuellen Bestimmungen vor allem in der Mukosa und der Leber eisenarmer Tiere voraus. In früheren Arbeiten (55, 109, 110) war es notwendig, die Gewebe mehrerer Tiere zu "poolen" oder größere Darmabschnitte zu verwenden. Dies ließ natürlich eine Betrachtung der individuellen Verläufe der Resorptionskinetik nicht zu. Außerdem ist es von Bedeutung, ob es unterschiedliche Werte von Ferritin in normalen und eisenarmen Ratten gibt. Gewebeferritinbestimmungen, die mit Hilfe eines Radioimmunoassays ermittelt wurden, gibt es nur wenige.
3. Brittin und Raval (77) bestimmten Ferritin per Immunotitration als Protein und nicht aufgrund seines Eisengehaltes, wobei beim Eisenmangel in der Mukosa des Darmes der Gehalt an Ferritinproteinen in etwa gleich groß ist, wie bei normalen Tieren mit ausgeglichener Eisenbilanz, der Eisengehalt des Ferritins jedoch im Eisenmangel geringer ist als im Normalzustand.

Des weiteren war es notwendig, die Aufnahme von ^{59}Fe in das Gewebeferritin während des Resorptionsvorganges zu ermitteln, um den möglichen Zusammenhang zwischen Eisenresorption und dem ins Ferritin inkorporierten Eisenanteil abzuschätzen. Hier war zu prüfen, ob sich Unterschiede zeigen zwischen eisenarmen und normalen Tieren.

4. Aufgrund neuerer wissenschaftlicher Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Eisen (II)-Sulfat und der Eisen (III)-Polymaltose-Komplex ein signifikant verschiedenes pharmakokinetisches Verhalten hinsichtlich Verteilungsvolumen, Clearance und Eliminationskonstante aufweisen (126).

Dies veranlaßte uns, Eisen (II)-Sulfat und Eisen (III)-Chlorid einerseits und den Eisen (III)-Polymaltose-Komplex andererseits, als Präparat, hinsichtlich der Verwertbarkeit und Utilisation bei eisenarmen und normalen Ratten zu untersuchen.

Aufgrund der erörterten Fakten lag es daher nahe, die Rolle des Ferritins für die Eisenresorption unter in vivo-Bedingungen bei der Ratte als Versuchstier näher zu charakterisieren.

B. A U F G A B E N S T E L L U N G

Ausgehend von den bisherigen Kenntnissen mußten folgende Punkte erarbeitet werden:

1. Zur quantitativen Bestimmung von Ferritin mußte eine empfindliche, speziesspezifische, immunologische Methode ausgearbeitet werden.
2. Es war zu prüfen, ob es wesentliche Unterschiede in der Bioverfügbarkeit und Utilisation von zwei- und dreiwertigen Eisenverbindungen gibt.
3. Es sollte geklärt werden, ob die Einbaurate von ^{59}Fe in Ferritin als Parameter für die Bioverfügbarkeit von Eisenpräparationen herangezogen werden kann.
4. Auf der Grundlage dieser Kenntnisse sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit Ferritin eine regulative Rolle bei der Eisenresorption zu spielen vermag.

C. E R G E B N I S S E

C. 1. Identifizierung des Ferritins

C. 1.1. Gelchromatographie

Die Gelchromatographie eignet sich außer zur Reinigung von Proteinen auch zu ihrer Molekulargewichtsbestimmung (13, 47). Zur Kalibrierung der Säule läßt man mehrere Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (s. Abb. 2) durch die Säule laufen und trägt den ermittelten K_{av} -Wert (s. S. 46) gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes auf.

Für die von uns isolierte Proteinfraction ermittelten wir mittels dieser Methode ein Molekulargewicht von 450 000 - 480 000 D (Abb. 2). Dieser Wert liegt innerhalb der Literaturwerte von 430 000 - 490 000 D (48, 49).

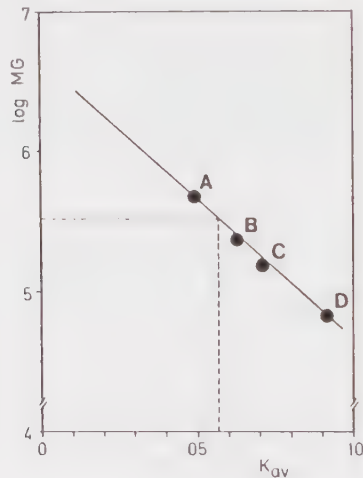


Abb. 2

Molekulargewichtsbestimmung von Ferritin durch Gelchromatographie

Abhängigkeit des K_{av} -Wertes * von Molekulargewicht (M_r).

Trennung über eine Sepharose 6B-Säule (0,9;80) cm)

Vergleichsproteine:	A) Myosin	530 000 D
	B) Katalase	240 000 D
	C) Aldolase	158 000 D
	D) Rinderserumalbumin	68 000 D

* K_{av} -Wert: Eine von Laurent und Killander (5) eingeführte Konstante bei der anstelle des inneren Volumens V_i das Gesamtvolumen V_t der Gelphase zur Berechnung verwendet wird. (s. auch S. 46 Gl. 2)

C.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Zwei unserer Ferritinpräparationen (b, c) und eine Vorstufe (a) wurden mit Markerproteinen (d) per SDS-Elektrophorese aufgetrennt (Abb. 3). Der Vergleich mit den Markerproteinen zeigt zwei deutliche Proteinbanden (H, L), die mit dem Molekulargewicht der Ferritinuntereinheiten übereinstimmen (s. Abb. 4). Durch Natriumdodecylsulfat (SDS) werden zusammengesetzte Proteine infolge Aufspaltung der Disulfidbrücken in ihre Untereinheiten zerlegt und in Tensidmizellen mit gleicher Außenladung solubilisiert. Durch Zusatz von β -Mercaptoethanol wird diese Dissoziation des Proteins gefördert und gleichzeitig die nachträgliche Bildung von Oligomeren durch Oxidation der SH-Gruppen vermindert (50).

Die so durch SDS aufgefalteten und denaturierten Proteinuntereinheiten haben jeweils ähnliche Form und Ladungsdichte und ihre elektrophoretischen Mobilitäten sind den Molekulargewichten umgekehrt proportional (8). In mehreren Elektrophoreseläufen wurden die elektrophoretischen Beweglichkeiten der Ferritinuntereinheiten zusammen mit Markerproteinen von niedrigem Molekulargewicht (A-F) bestimmt, wie in Abb. 3 dargestellt.

Daraus wurden die Molekulargewichte der Untereinheiten nach Weber und Osborn (8) ermittelt (Abb. 4) und mit Literaturdaten verglichen.

Für die schweren Untereinheiten (H) bestimmten wir ein Molekulargewicht von ca. 21 000 D, für die leichten Untereinheiten (L) von ca. 19 000 D. Auch dieses Ergebnis stimmt gut mit Literaturangaben von Arosio et al (2) überein.

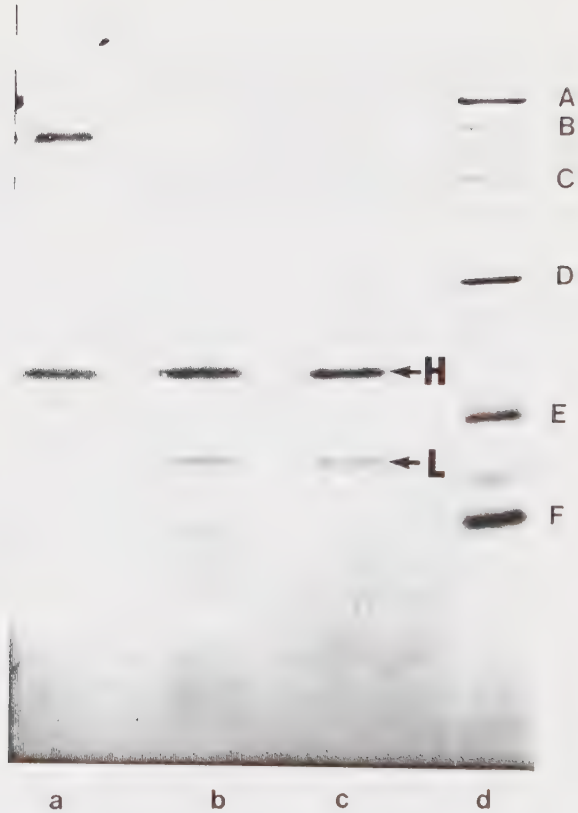


Abb. 3

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von Ferritin

(Sammegel: 5%; Trenngel: 15%; aufgetragene Menge: 15 µg)

a) Präparationsvorstufe

b,c) eigene Ferritin Präparationen (H-bzw. L-Untereinheiten)

d) Markerproteine "low molecular weight" der Fa. BIO RAD

A) Phosphorylase B	94 000 D
B) Rinderserumalbumin	68 000 D
C) Ovalbumin	43 000 D
D) Carboanhydrase	30 000 D
E) Trypsininhibitor	21 000 D
F) Lysozym	14 000 D

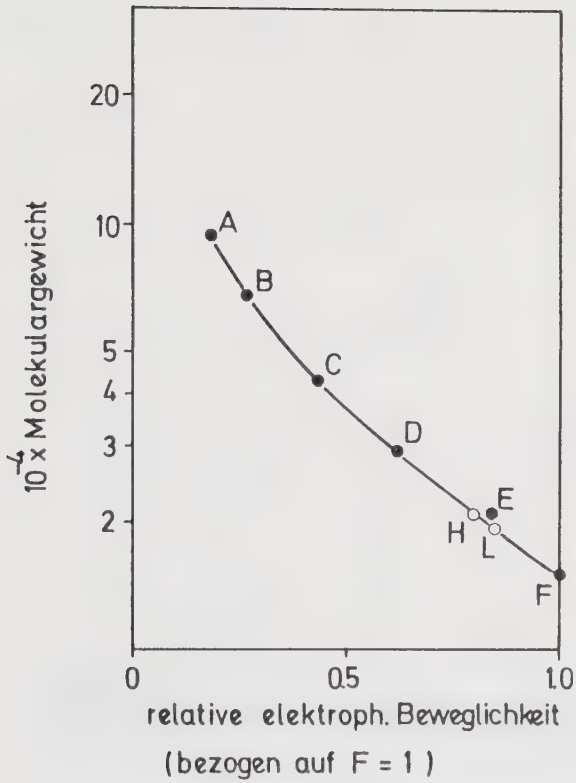


Abb. 4

Bestimmung des Molekulargewichtes der Ferritinuntereinheiten aus der elektrophoretischen Beweglichkeit (vgl. Abb. 3)

Markerproteine "low molecular weight" der Fa. BIO RAD (s. Abb. 3d, A-F)

Ferritinuntereinheiten: H, L

C. 1. 3. Aminosäureanalyse

Mit Hilfe des Aminosäureanalysators wurde nach Säurehydrolyse die Aminosäurezusammensetzung für Rattenleberferritin erhalten. Eine Analyse unserer Rattenleberferritinproben wurde freundlicherweise im Labor von Prof. R. Crichton (Unité de Biochimie Institut Lavoisier Louvain-La-Neuve, Belgique) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Probe stand im Einklang mit den Literaturergebnissen von Hübers et al (2).

Tab. 1

Aminosäureanalyse von Rattenleberferritin, I und II eigene Isolierungen, III literaturwerte von Hübers et al (3)
(Angaben in Mol.%)

	I	II	III
ASP	20,87	20,58	19,6
THR	6,39	7,16	6,6
SER	8,23	9,12	9,1
GLU	26,00	24,02	25,1
PRO	6,04	6,75	4,7
GLY	12,23	12,60	10,5
ALA	14,20	13,16	14,3
VAL	7,04	8,02	6,9
MET	0,94	1,12	2,4
ILE	4,14	4,15	3,1
LEU	25,52	24,81	23,9
TYR	5,41	4,81	4,0
PHE	7,56	7,91	6,7
HIS	9,02	8,18	5,9
LYS	10,05	10,45	10,5
ARG	8,35	9,14	9,6

C.2. Voraussetzungen und Vorarbeiten für die quantitative Bestimmung des Ferritins

Voraussetzung für die immunologische Bestimmung des Rattenferritins ist die Erzeugung eines spezifischen Antikörpers. Dazu bedarf es eines möglichst reinen Antigens in ausreichender Menge (1-2 mg Ferritin/Kaninchen). Der sensitive Immunblot, ein Doppel-Antikörper-Assay ist so angelegt, daß er unter optimalen Bedingungen bis zu 100 pg eines Antigens erkennen kann.

Frühe, daher schwache immunologische Antworten sind mit dem klassischen Diffusionstest nach Ouchterlony nicht bestimmbar, können aber mit dem erwähnten Immunblot-Assay erfasst werden. Der Assay kann also für die Charakterisierung von Antisera herangezogen werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der von uns entwickelte Antikörper gegen Rattenferritin (s.S. 65) untersucht, wobei dieser Ferritin bis zu einer Konzentration von 3,1 ng/ μ l (Abb. 5/g) erkannte. Einen ähnlich empfindlichen Test zur Ermittlung der Spezifität und Sensitivität des Ferritinantikörpers haben wir bisher in der Literatur nicht gefunden.

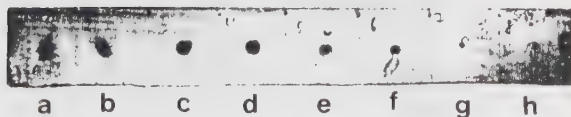


Abb. 5

Immunblot-Assay von Anti-Ferritin. 1 μ l Ferritin-Lösung wurde auf einen Nitrozellulosestreifen aufgetragen und dann Anti-Ferritin (IgG-Fraktion) in einer Konzentration von 25 μ g/ml zugegeben. Nach Waschen schloß sich eine weitere Behandlung mit einem Anti-IgG an, an welches Peroxidase gekoppelt war. Über die von der Peroxidase bewirkte Farbreaktion mit 4-Chlor-1-naphthol (Substrat für Peroxidase) konnte die Menge an Anti-Ferritin semiquantitativ bestimmt werden (a-h: 100 - 1,5 ng Ferritin).

Auch mit dem üblichen Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony konnte die Qualität eines Antiserums (Titerbestimmung) ermittelt werden. Außerdem dient dieser Test zur Erfassung der Spezifität eines Antikörpers. Läßt man das gleiche Antigen (Ferritin) aus verschiedenen Spezies (Rattenleberferritin und Pferdemilzferritin) gegen den Antikörper (Anti-Rattenferritin) diffundieren, so erhält man eine Teilidentität (an einer Spornbildung erkennbar). Bei einer Reaktion verschiedener Antigene (z.B. Serumproteine) aus der gleichen Spezies mit dem monospezifischen Antikörper (Anti-Ferritin) erhält man keine Reaktion (Abb. 6a,b,c).

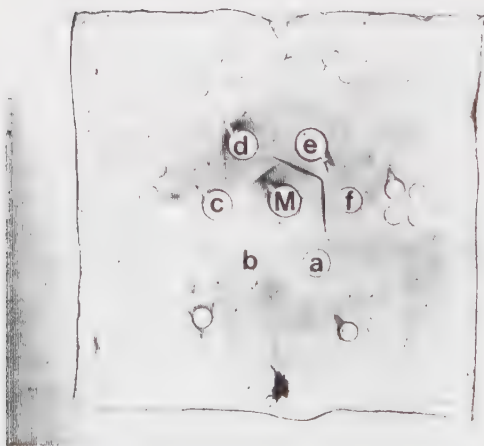


Abb. 6a

Ouchterlony Doppeldiffusionstest zur Ermittlung der Teilidentität und Non-Identität von einem monospezifischen Antikörper gegen Ferritin (M). Rattenleberferritin (e, f) und Pferdemilzferritin (d) (Spornbildung deutet auf eine Teilidentität der Antigene hin) (a) und (b) Rattenleberferritin (c) Rattenalbumin.

Der Ouchterlony Test dient des weiteren zur Bestimmung der Identität eines Antigens aus verschiedenen Organen einer Spezies (Abb. 6b), denn Mukosa- und Leberferritin sollten mit dem Radioimmunoassay gemessen werden. Hierfür ist eine vollständige Identität notwendig.

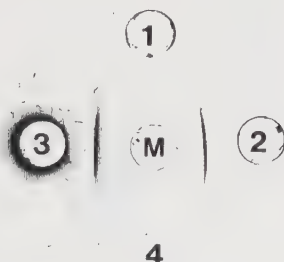


Abb. 6b

Ouchterlony Doppeldiffusionstest von hitzenaturierten Gewebeerüberständen der Mukosa (2) und der Leber (3), gereinigtes Rattenferritin (1, 4), Anti-Rattenferritin (M)

C. 2. 1. Mengenabgleich von Ferritin aus verschiedenen Präparationen im Laurell-Assay

Neben der photometrischen Proteinbestimmung nach Lowry (17) bestimmten wir den Ferritingehalt unserer Ferritinpräparationen mit Hilfe des Laurell-Rocket-Assays (24) (Abb. 7a). Ferritinchargen verschiedener Isolierungen konnten mit Rattenleberferritin der Fa. ucb bioproducts s.a. Belgien, das nach Angaben von Crichton (3) hergestellt wird, abgeglichen werden. Mit dieser Methode konnten Ferritinmengen bis zu $0,1 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ Homogenat erfasst werden. Ähnlich lagen die Ergebnisse von Carmal et al (25) die Rattenleberferritin von Tieren mit ausgeglichenem Eisenstatus bestimmten. Abgesehen von der größeren

Sensitivität gegenüber den photometrischen Proteinbestimmungsmethoden sieht man hier die intakte immunologische Reaktion.



Abb. 7a

Laurell Assay von Rattenferritin (24, 25)

a) 1,2 μg ; b) 0,6 μg ; c) 0,3 μg ; d) 0,15 μg Ferritin/10 μl in einem 1 %igen Agargel. Die Antikörperkonzentration im Gel war ebenfalls 1 %ig (IgG c = 1,6 mg/ml)

Spannung: $U = 8 - 10 \text{ V/cm}$, die Laufzeit betrug ca. 2 h.

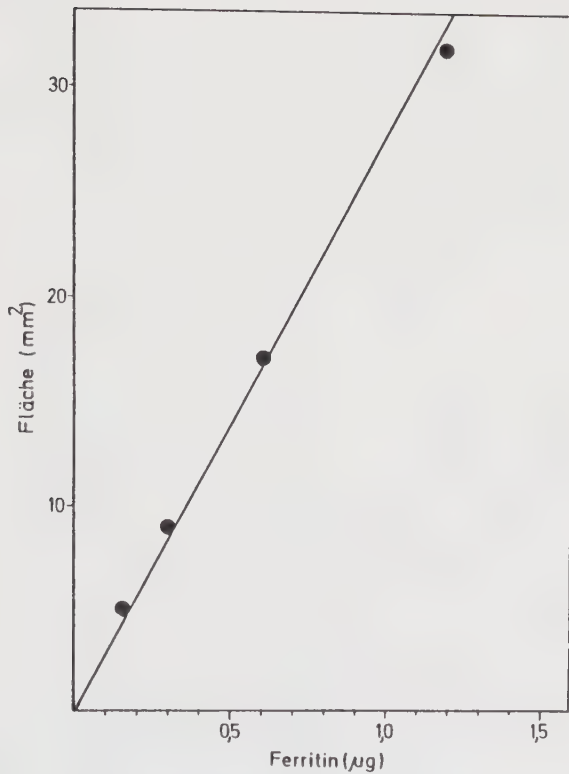


Abb. 7b

Eichgerade von Ferritin im Laurell-Assay
(Konzentrationsbereich: $c = 0,15 - 1,2 \mu\text{g}$ Ferritin)
jeder einzelne Meßpunkt setzt sich aus drei Einzel-
bestimmungen zusammen, $M \pm SD$ ($n = 3$)
Ordinate: Fläche der "Rockets" (s. Abb. 7a) in mm^2
Abszisse: Konzentration von Ferritin in μg

C. 2.2. Radioaktive Markierung von Ferritin

Die radioaktive Markierung des Antigens ist neben der Spezifität der Antikörper der wichtigste Teil zur Erstellung eines Radioimmunoassays. Gewöhnlich wird ^{125}I -Iod zur Markierung von Proteinen verwendet, da dieses Isotop als β -Strahler einfach detektiert werden kann.

Zwei Punkte mußten nach Umsetzung von Rattenleberferritin mit Na^{125}I erfüllt werden.

- a) ein immunologisch intaktes Protein
- b) ein Produkt hoher spezifischer Aktivität

Abb. 8 stellt drei Elutionsprofile von ^{125}I -Ferritin über Sepharose 6B dar. Im Fall A) erkennt man keinen Ferritinpeak der bei einem K_{av} -Wert (s.S. 46, Gl.2) von 0,375 erscheinen müßte, obwohl eine immunologische Reaktivität in diesem Bereich festzustellen ist. Die Markierung B) ergibt ein Produkt mit einem deutlichen Peak beim K_{av} -Wert von Ferritin und einer intakten immunologischen Reaktion. Das Produkt weist jedoch eine niedrige spezifische Aktivität auf (0,27 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), die für einen sensitiven RIA nur eingeschränkt brauchbar ist. C) zeigt eine ideale Markierung mit hoher spezifischer Aktivität (4,35 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) und maximaler Bindung (100 %) an Anti-Ferritin. Solch ein iodiertes Antigen erfüllt die obigen Voraussetzungen und kann in einem Radioimmunoassay eingesetzt werden.

Die unterschiedlichen Markierungsprodukte sind auf reduzierende Rückstände in der Proteinlösung (wie z.B. Abb. 8A) und auf Verwendung von Na^{125}I -Chargen (Abb. 8B) niedriger spezifischer Aktivität zurückzuführen. Beachtet man diese Punkte, so erhält man nach der Iodierung Produkte, die als "Tracer" für einen Assay verwendet werden können.

Schwierigkeiten bereitete die eindeutige Identifizierung des ^{125}I -markierten Ferritins und dessen Abtrennung von anderen

markierten Begleitprodukten (s. Abb. 8). Eine Kombination von Gelfiltration über eine Sepharose 6B-Säule und anschließender Identifizierung der ^{125}I -Ferritinfraktion mit Hilfe von Anti-Ferritin IgG wurde so eindeutig in der Literatur nicht beschrieben.

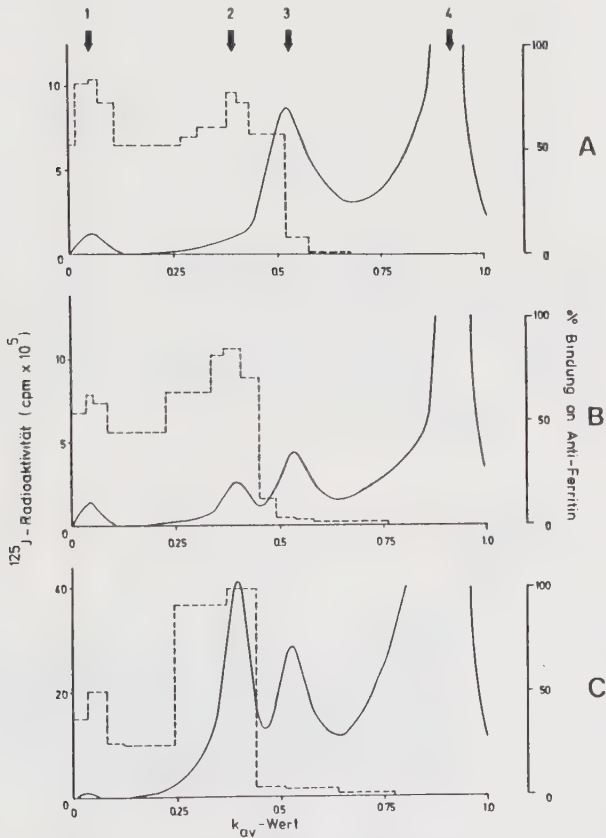


Abb. 8

Sepharose 6B Elutionsprofil von ^{125}I -Ferritin nach Chloramin T Markierung (Peak 1, 2, 3 und 4 sind mit Pfeilen angezeigt)
 — ^{125}I -Radioaktivitätsprofil

--- Immunologische Reaktivität, bzw. Bindung an Anti-Ferritin

A: ^{125}I -Ferritin mit einer spezif. Aktivität (0,10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein)

B: ^{125}I -Ferritin spezif. Aktivität (0,27 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein). Das Protein wurde vor der Markierung gegen 0,2 M Phosphatpuffer pH = 7,2 dialysiert.

C: ^{125}I -Ferritin spezif. Aktivität (4,3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) Dialyse des Proteins analog B) und Verwendung von 0,5 mCiNa ^{125}I hoher spezif. Aktivität.

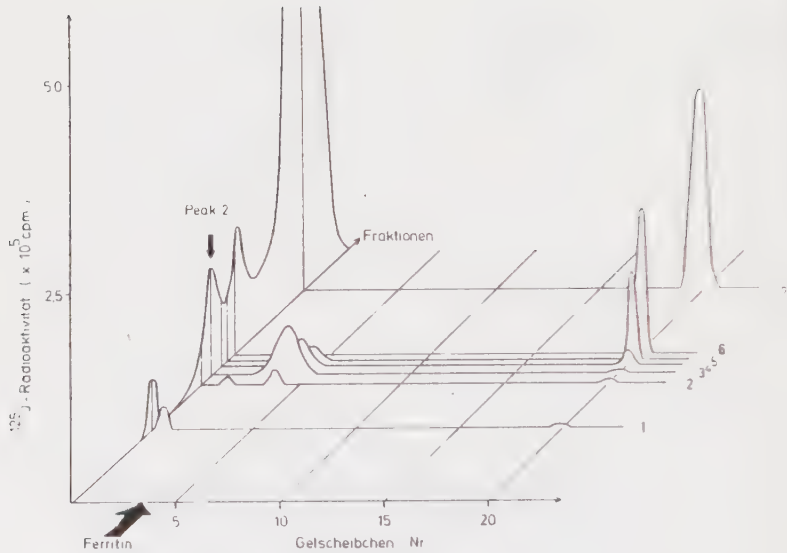


Abb. 9

Elektrophoretische Mobilität gelchromatographisch getrennter Fraktionen von ^{125}I -markiertem Ferritin (Abb. 8 B). Die von 1 - 7 durchnummerierten Elektroferogramme repräsentieren Aliquots von Peak 1, 2, 3 und 4 der per Gelchromatographie aufgetrennten ^{125}I -Markierung von Ferritin (s. Abb. 8 B). Ferritin erscheint in Peak 2 (Elektrophoresbedingungen s. Ka. D. 6. 5., Gelchromatographiebedingungen s. Ka. D. 6. 1.)

Außer der chromatographischen Trennung von markiertem Ferritin und dessen immunologischer Reaktivität wurde die PAG-Disk-Gel-Elektrophorese zur Prüfung auf ein intaktes Protein herangezogen. Unter dem Einfluß des elektrischen Feldes trennt sich das ^{125}I -markierte Ferritin von anderen Iodprodukten (s. Abb. 9). Die elektrophoretische Analyse des Peak 2 ergab einen homogenen Radioaktivitätspeak, dessen R_f -Wert dem von Ferritin entsprach.

C. 2. 3. Erstellung des Radioimmunoassays

Nachdem das Antigen isoliert, der dazu spezifische Antikörper entwickelt und die radioaktive Markierung des Antigens erfolgt waren, mußte für den RIA ein Verfahren gefunden werden, das die Trennung des antikörpergebundenen Antigens vom freien Antigen erlaubt.

Trennmethoden mit Polyethylenglycol und Ammoniumsulfat (57, 58) erwiesen sich als nicht durchführbar, da bei 50 %iger Ammoniumsulfatsättigung auch Ferritin ausfällt. Die Anti-IgG Methode hingegen nach Minden et al (6) ließ sich für den Radioimmunoassay anwenden. Bei dieser Methode wird das antikörpergebundene Antigen mit einem zweiten Antikörper (reagiert mit dem ersten Antikörper) ausgefällt. Um für diese Ausfällung eine optimale Präzipitatsbildung zu erhalten, wurde eine Titrationskurve (Abb. 10) nach Minden et al (6) erstellt.

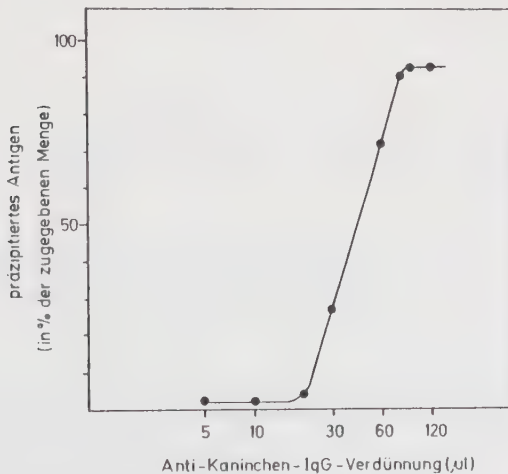


Abb. 10

Titrationsskurve zum Präzipitationstest nach Minden et al (6), zu 20 µg ^{125}I -IgG wurden steigende Konzentrationen Anti-IgG (Kat. Nr. R-5001; Fa. Sigma München) von 5; 10; 20; 30; 60; 80; 90 und 120 µl hinzugegeben.

Wie aus Abb. 10 zu sehen ist, erfolgt die optimale Präzipitation von 20 µg Anti-Ferritin (IgG) aus Kaninchenserum mit mindestens 100 µl Antikaninchen IgG (Kat. Nr. R-3001, Fa. Sigma München).

Im kompetitiven Radioimmunoassay, bei dem das markierte Antigen mit dem unmarkierten Antigen um die Bindungsstellen am Antikörper konkurriert, müssen diese in limitierter Anzahl vorhanden sein, d.h., die Antikörpermenge muß so bemessen werden, daß sie gerade für die Bindung des markierten Antigens ausreicht. Besser noch ist eine etwas geringere Menge (ca. 50 - 70% der Titrationsmenge). Diese Menge wird in einem sogenannten "Pre-Assay" ermittelt (56).

Abb. 11 zeigt einen typischen Verlauf eines "Pre-Assay's" zur Ermittlung der notwendigen Antikörpermenge.

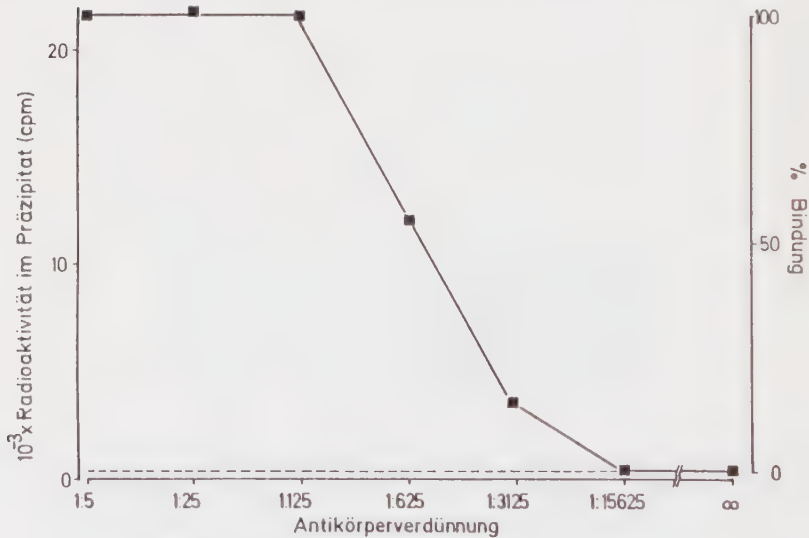


Abb. 11

"Pre-Assay" zur Bestimmung der optimalen Antikörperverdünnung für den kompetitiven Radioimmunoassay (Antikörper ist Anti-Ferritin, IgG c = 1,6 mg/ml)

— Assay Kurve; --- unspezif. Bindung. Die für den RIA pro Ansatz einzusetzende Antikörpermenge war 50 µl einer 1:250 Verd. des Anti-Ferritins (IgG c = 1,6 mg/ml) demnach 0,32 µg IgG (D. 5.)

Nach Prüfung aller Voraussetzungen läßt sich ein Radioimmunoassay von Rattenferritin in einem Meßbereich zwischen 3 - 50 ng/ml aufstellen (Abb. 12).

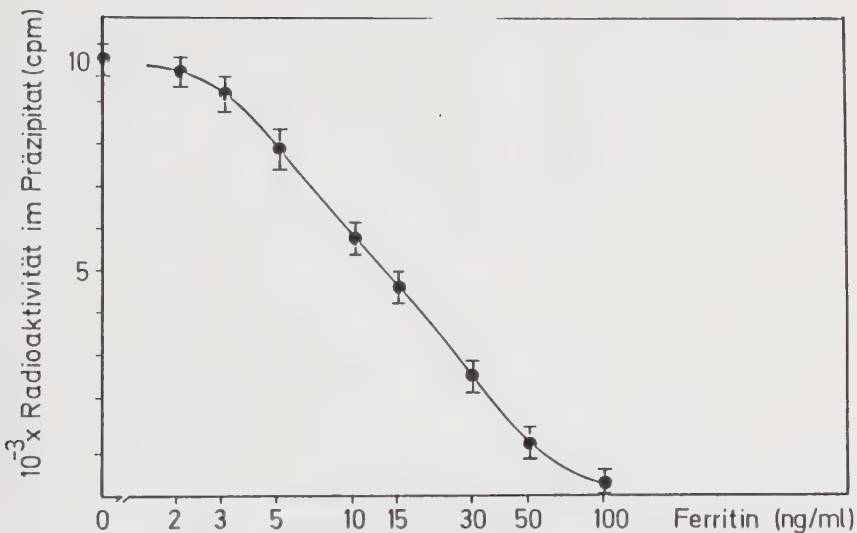


Abb. 12

Standardkurve eines Radioimmunoassays (linearer Meßbereich 3 - 50 ng/ml), jeder eingezeichnete Meßpunkt setzt sich aus drei Einzelbestimmungen zusammen. $M \pm SD$ ($n = 3$).

Ein Präzisionsmaß des Tests und seiner zuverlässigen Reproduzierbarkeit ist die Intra- und Inter-Assay-Varianz. Als Beispiel haben wir 46 Mukosaproben wahllos herausgegriffen, Ferritin per RIA gemessen (Doppelbestimmungen) und die Variationskoeffizienten ($V_r \%$) errechnet.

Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 und 3 zusammengestellt, der Intra-Assay-Variationskoeffizient lag zwischen 4,9 - 9,8 %.

Tab. 2

Intra-Assay-Variationskoeffizient (V_r %) von Mukosaferritinbestimmungen.

n	17	10	11	8
Bereich µg/ml	0-0,5	0,51-0,89	0,9-2,0	2,1-4,5
$\bar{x}$, µg/ml	0,370	0,656	1,56	3,32
SD, µg/ml	0,075	0,123	0,343	0,918
V_r %	4,90	5,94	6,63	9,80

$$V_r \% = \frac{100s}{\bar{x} \sqrt{n}} \quad (x > 0) \quad (Gl.1)$$

V_r % = Variationskoeffizient in %

S = Standardabweichung

$\bar{x}$ = Mittelwert der Proben

n = Anzahl der untersuchten Proben

Die Bestimmung der Inter-Assay-Varianz erfolgte durch Messung von vier verschiedenen Mukosaproben in drei aufeinanderfolgenden Assays. Die Ergebnisse sind Tabelle 3 zu entnehmen, wobei der Inter-Assay-Variationskoeffizient zwischen 2,7 - 12,2 % lag.

Inter-Assay- und Intra-Assay-Variationskoeffizient liegen durchaus im Genauigkeitsbereich von Ferritinbestimmungen per Radioimmunoassay (34, 37).

Tab. 3

Inter-Assay-Variationskoeffizient (V_r %) von vier Mukosa-ferritinproben (Doppelbestimmungen) gemessen mit drei aufeinanderfolgenden Assays.

Proben Nr.	Assay 			$\bar{x}(\text{ng})$	SD	$V_r\%$
	1	2	3			
1	580	540	635	585	47,7	4,7
2	1160	1305	1333	1266	92,9	4,2
3	1800	1365	2100	1755	369,0	12,2
4	395	383	420	399	18,9	2,7

C. 3. Überprüfung der ^{59}Fe -Häm Ausschüttelmethode mit HCl als Dissoziationsmittel

Die Bestimmung des ^{59}Fe -Einbaus in Hämoglobin und damit die Utilisation der verschiedenen Eisenderivate erfolgte nach Abtrennung des Häms von Globin.

Teale (40) spaltete Häm von Globin mit Hilfe von 2 N HCl als Dissoziationsmittel. Die Abtrennung des Proteins vom Häm erreichte er durch Ausschütteln des Häms in Methylethylketon, wobei der Globinanteil in der wässrigen Phase verblieb. Sein Ziel war, ein natives Globin abgetrennt von Häm zu erhalten. Unser Ziel dagegen war ^{59}Fe -Häm von Non-Hämeisen (^{59}Fe) abzutrennen und damit die Utilisation der verschiedenen Eisenderivate zu ermitteln.

Wir vermuteten, daß Eisensalze mit Salzsäure Komplexe bildeten, die in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Somit wäre eine Kontaminierung mit ^{59}Fe der organischen Phase bei diesem

Verfahren nicht auszuschließen. Da die Messung der Radioaktivität in dieser Phase als Maß für den Einbau von ^{59}Fe in das Häm herangezogen wird, bedeutet eine Verschleppung in die Hämphase eine Messung erhöhter Einbauraten. Daher wurde in unseren Versuchsansätzen $^{59}\text{Fe}-(\text{FeCl}_3)$ mit unmarkiertem FeCl_3 (0; 25; 250 μg) gemischt, analog der Ausschüttelmethode von Ka. D. 9. einmal mit 2 N HCl und zum anderen mit 9 M H_3PO_4 versetzt und die Verteilung des ^{59}Fe in die Phasen untersucht.

Das Ergebnis ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4
Kontamination der Cyclohexanonphase mit Non-Hämeisen (^{59}Fe)

FeCl_3 (μg)	HCl-Spaltung			H_3PO_4 -Spaltung		
	0	25	250	0	25	250
Gesamtakt. (cpm)	1812	1812	1812	1829	1829	1829
H_2O -Phase (cpm)	900	935	918	1789	1770	1778
Cyclohexanonphase (cpm)	887	837	867	13	30	18
Verschleppung in die Cyclohexanon- phase (%)	49	46,2	47,8	0,71	1,09	0,98

Die ^{59}Fe -Verschleppung (von Non-Häm ^{59}Fe -Eisen) in die Cyclohexanonphase mit Salzsäure ergab das eindeutig schlechtere Ergebnis. 48% der Radioaktivität wurden in die Cyclohexanonphase verschleppt, im Gegensatz zu phosphorsäurebehandelten

Proben (durchschnittlich 1%).

Dieses Ergebnis bestätigte uns, die ^{59}Fe -Hämbestimmung mit Phosphorsäure als Dissoziationsmittel durchzuführen, das nach unserer Kenntnis für die ^{59}Fe -Hämbestimmung bisher noch nicht beschrieben wurde.

C.4. Ergebnisse der Tierversuche

Die Resorptions- und Utilisationsversuche, sowie die Untersuchung der ^{59}Fe -Kinetik der verschiedenen Eisenderivate wurde an zwei Gruppen von Ratten ausgeführt. Zum einen an Kontrolltieren mit einer ausgeglichenen Eisenbilanz und zum anderen an eisenarmen Tieren, die einen künstlich erzeugten Eisenmangelzustand aufwiesen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, war es notwendig, den Grad der Eisenarmut zu standardisieren und den Eisenstatus der eisenarmen Tiere gegenüber den der Tiere mit ausgeglichener Eisenbilanz abzugrenzen. Als Parameter (44, 59), die den Eisenmangel näher charakterisieren dienten vor allem der Hämoglobingehalt im Blut (Senkung auf ca. 50% der Norm), der Plasmaeisengehalt (Verminderung auf 57% der Norm) und die freie Eisenbindungskapazität im Plasma (auf 30% der Norm).

Weitere Angaben sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 5

Körpergewicht und hämatologische Daten bei normalen und eisen-
armen Ratten $M \pm SD$ ($n = 60$)

Parameter	normal	eisenarm
Körpergewicht bei Versuchsbeginn (g)	342,0 $\pm$ 40,7	288,6 $\pm$ 36,4
Hämoglobingehalt (g/100 ml)	15,0 $\pm$ 1,7	7,6 $\pm$ 1,4
Hämatokrit (%)	45,0 $\pm$ 5,3	25,8 $\pm$ 5,3
Eisen im Plasma (μ g/100 ml)	201,0 $\pm$ 19,0	35,0 $\pm$ 6,0
Freie Eisenbindungskapazität (μ g/100 ml)	160,0 $\pm$ 20,0	550,0 $\pm$ 60,0

C. 4. 1. Gewebeferritinbestimmungen

Ferritin wurde mit Hilfe des Radioimmunoassays bestimmt. Als Standard diente Rattenleberferritin, das auch zur Erzeugung der Antikörper verwendet wurde. Die Gewebhomogenate wurden nach der Hitzedenaturierung (s. Schema II) mit 0,15 M Phosphatpuffer pH = 7,2 verdünnt, so daß ihr zu ermittelnder Wert im linearen Bereich der Eichgerade lag (s. Abb. 12).

C. 4. 1. 1. Gehalt an Leber- und Mukosaferritin

Die Ergebnisse der immunologischen Bestimmung des Ferritins wurden sowohl auf die Ausgangsmengen der Aufarbeitung zurückgerechnet, als auch auf das Feuchtgewicht des Leber- bzw. Mu-

kosagewebes. Die Werte der einzelnen Versuchsreihen sind in Tabelle A6 und A7 enthalten, die Mittelwerte hiervon sind in der folgenden Übersichtstabelle zusammengefaßt.

Leber- und Mukosaferritinwerte von normalen und eisenarmen Ratten in $\mu\text{g/g}$ Gewebefeuchtgewicht

	normal	eisenarm
Leberferritin ($\mu\text{g/g}$ Gewebefeuchtgewicht)	207,0	3,99
Mukosaferritin ($\mu\text{g/g}$ Gewebefeuchtgewicht)	10,9	2,59

Der Leberferritingehalt von normalen und eisenarmen Tieren unterscheidet sich fast um das 50-fache, beim Mukosaferritin beträgt der Unterschied nur ca. das 4-fache. Berechnet man die Ferritinwerte vom Gewebefeuchtgewicht auf Ferritin/mg Protein (die Proteinbestimmung der Gewebe erfolgte nach der Methode von Lowry (17)), so erhält man folgende Werte:

Leber- und Mukosaferritinwerte von normalen und eisenarmen Ratten in ng/mg Protein

	normal	eisenarm
Leberferritin (ng/mg Protein)	967,0	21,0
Mukosaferritin (ng/mg Protein)	100,0	16,0

Aus diesen Ergebnissen geht klar hervor, daß die herkömmlichen Ferritinbestimmungen besonders bei eisenarmen Tieren weit unter der notwendigen Empfindlichkeit des Radioimmunoassays liegen.

C. 4. 2. Plasmaferritinbestimmungen

Plasmaferritin wurde ebenfalls mit Hilfe des Radioimmunoassays bestimmt. Folgende Übersichtstabelle stellt die Ergebnisse dar.

Plasmaferritinwerte von normalen und eisenarmen Tieren
in ng/ml

	normal	eisenarm
Plasmaferritin (ng/ml)	90,5 $\pm$ 86,6	62,3 $\pm$ 54,5

Der Meßbereich für normale Tiere war von 17 - 205 ng/ml, für eisenarme Tiere 12 - 173 ng/ml.

Die Werte der einzelnen Versuchsreihen sind in Tabelle A12 auf Seite 117 enthalten.

Die Genauigkeit der Plasmaferritinbestimmungen wurde in einem Experiment überprüft, in dem zu Plasmaproben exogenes Ferritin verschiedener Mengen zugegeben und Ferritin per RIA gemessen wurde. Aus der errechneten Wiederfindungsrate an Ferritin kann die Präzision des Tests bestimmt werden. Wie aus Tabelle 6 Seite 31 zu sehen ist, liegt die Wiederfindungsrate sowohl nach Zugabe von 5 ng als auch von 10 ng in etwa demselben Bereich (95 - 123%), womit die Messungen trotz der hohen Streuungen als richtig bestätigt sind.

Tab. 6

Bestimmung der Wiederfindungsrate von exogen zugesetztem Ferritin zu Plasma-proben verschiedener Volumina und Ferritingehalte

ProbenNr.	ml Plasma- volumen	Ferritin- gehalt in 100 µl Probe (ng)	Ferritin- gehalt nach Zugabe von 5 ng exoge- nem Ferritin	Wieder- findungs- rate in %	Ferritin- gehalt nach Zugabe von 10 ng exoge- nem Ferritin	Wieder- findungsrate in %
1	1	4,7	9,2	94,9	18,0	122,5
2	0,33	1,7	7,1	105,9	14,0	119,7
3	0,33	12,5	20,0	114,3	26,0	115,6

C. 4. 3. Kinetik der Retention von Eisen aus verschiedenen ^{59}Fe -Derivaten nach oraler Gabe

Normalen und eisenarmen Ratten wurden per Schlundsonde verschiedene ^{59}Fe -Derivate verabreicht und die Retention nach 0,5; 2,5; 6 und 28 Stunden im Ganzkörperzähler gemessen. In jedem Fall erhält man beim Vergleich normaler und eisenarmer Ratten eine gesteigerte Aufnahme im Eisenmangelzustand. Die Eisensalze ^{59}Fe -Eisen (III)-Chlorid und ^{59}Fe -Eisen (II)-Sulfat zeigen gegenüber dem ^{59}Fe -Eisen (III)-Polymaltosekomplex (Fe-PM) im wesentlichen denselben zeitlichen Verlauf. Im Normalzustand steigt die Retention an und erreicht nach 6 Stunden das Maximum. Der 28-Stunden-Retentionswert der Salze liegt bei 50% der ^{59}Fe -Dosis und deutet einen abfallenden Verlauf an. Im eisenarmen Zustand erfolgt der Anstieg schneller, wobei im Gegensatz zum Normalzustand nach 28 Stunden kein

wesentlicher Abfall der Retention zu beobachten ist. Der Eisenpolymaltosekomplex hat im Vergleich zu den Eisensalzen bei frühen Zeitpunkten (0,5; 2,5 h) eine bedeutend niedrigere Retention. Diese steigt allerdings kontinuierlich an und erreicht auch nach 28 Stunden nur annähernd die Werte, die bei den Eisensalzen (Abb. 13) nach 28 Stunden erreicht werden.

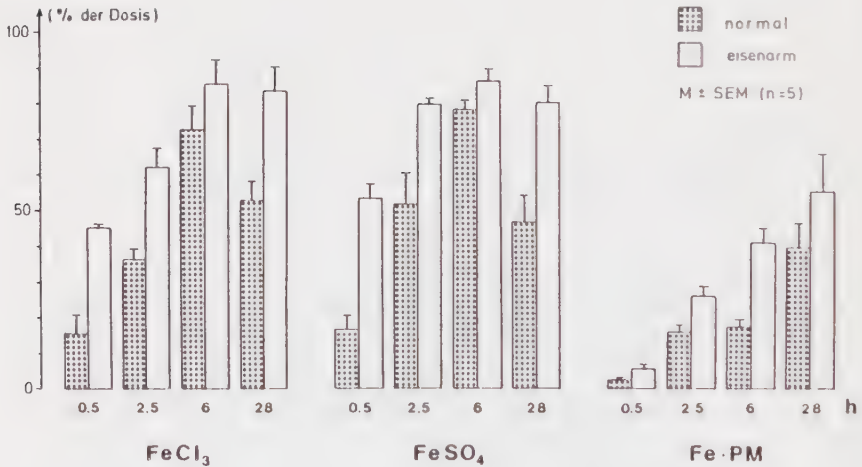


Abb. 13

⁵⁹Fe-Retention eisenarmer und normaler Ratten nach einer oralen Einzeldosis verschiedener ⁵⁹Fe-markierter Eisenverbindungen. Die Dosis betrug 0,2 mg Fe/kg Körpergewicht. Ordinate: Retention in % der verabreichten Dosis. Abszisse: Versuchsdauer in Stunden; kein signifikanter Unterschied zwischen FeCl₃ und FeSO₄; signifikanter Unterschied zwischen den Eisensalzen und ⁵⁹Fe-Eisenpolymaltose, statistische Zahlenwerte s. Anhang II, Tab. I, Einzelwerte s. Tab. A1

C. 4.4. Zusammenhang zwischen maximalem Plasmaeisenanstieg und 0,5 h Eisenresorption

Ekenved (54) verglich am Menschen die ^{59}Fe -Retention durch Messung im Ganzkörperzähler mit dem Plasmaeisenanstieg über Stunden. Zwischen beiden Parametern bekam er eine relativ gute Korrelation ($r = 0,86$) und konnte damit zeigen, daß die Gesamtaufnahme von Eisen durchaus über die Messung des Plasmaeisenanstieges bestimmt werden kann.

Daraufhin haben wir ebenfalls unsere im Ganzkörperzähler gemessenen Retentionen mit dem maximalem Plasma ^{59}Fe -Anstieg verglichen. Auch wir erhalten in unserem Versuchsansatz (Abb. 14) eine gute Korrelation ($r = 0,94$), ein Hinweis dafür, daß auch für die Ratte ähnliches gilt.

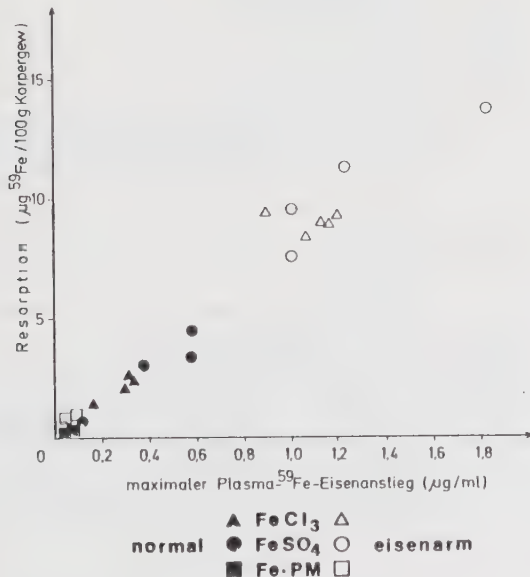


Abb. 14

Korrelation zwischen max. Plasmaeisenanstieg und 0,5-h-Eisenresorption
Als Resorptionswerte wurde die ^{59}Fe -Retention (nach 0,5 h) im Ganzkörperzähler zugrunde gelegt.

Ordinate: Resorption ($\mu\text{g } ^{59}\text{Fe}/100\text{ g Körpergewicht}$)

Abzisse: max. Plasmaeisenanstieg ($\mu\text{g } ^{59}\text{Fe}/\text{ml}$) nach 0,5 h

c. 4.5.1. ^{59}Fe -Aufnahme in die Duodenalmukosa normaler und eisenarmer Ratten

Normale Tiere nehmen grundsätzlich mehr Eisen in die Mukosa auf, als eisenarme Tiere, wobei $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ jeweils eine ähnliche Kinetik zeigen. Die höchste Gewebeseisenkonzentration der beiden Eisensalze liegt bei unseren Messungen zwischen 0,5 und 2,5 h bei den normalen Tieren und fällt nach 6 h auf 50% des Maximalwertes ab (Abb. 15). Die ^{59}Fe -Aufnahme aus dem Eisenpolymaltosekomplex liegt insbesondere nach 0,5 und 2,5 h wesentlich niedriger und beträgt nach 6 h ca. 50% des 2,5 h-Wertes.

Der ^{59}Fe -Gewebeseisengehalt eisenarmer Tiere verläuft bei den mit $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ geschlundeten Ratten ähnlich und liegt wesentlich niedriger als bei den Kontrolltieren. Die $^{59}\text{Fe-Fe-PM}$ -Gewebekonzentrationen eisenarmer Tiere zeigen über die gesamte Versuchsdauer eine relativ gleichbleibende Aufnahme in die Duodenalmukosa. Der Eisenanteil im Ferritin der Duodenalmukosa zeigt in seinem zeitlichen Verlauf große Ähnlichkeit mit dem ^{59}Fe -Gehalt im Gewebe. Auch hier war der Ferritineisenanteil der normalen Tiere bedeutend höher, als der der eisenarmen Tiere. Das Ferritineisen der Kontrolltiere die $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ bekommen hatten, erreichte seinen höchsten Wert zwischen 0,5 und 2,5 h, wogegen die der $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ -Gruppe zwischen 0,5 und 2,5 h einen konstanten Wert erreichten, der nach 28 h-Versuchsdauer bei beiden Kontrolltiergruppen ähnlich niedrig lag. Die ^{59}Fe -Ferritineisenwerte eisenarmer Tiere nahmen über die Versuchsdauer kontinuierlich ab. Auch bei den Tieren die mit dem ^{59}Fe -Eisenpolymaltosekomplex behandelt wurden, war der ^{59}Fe -Ferritineisengehalt normaler und eisenarmer Tiere - über die gesamte Versuchsdauer betrachtet - im Verlauf sehr ähnlich mit dem ^{59}Fe -Gewebegehalt.

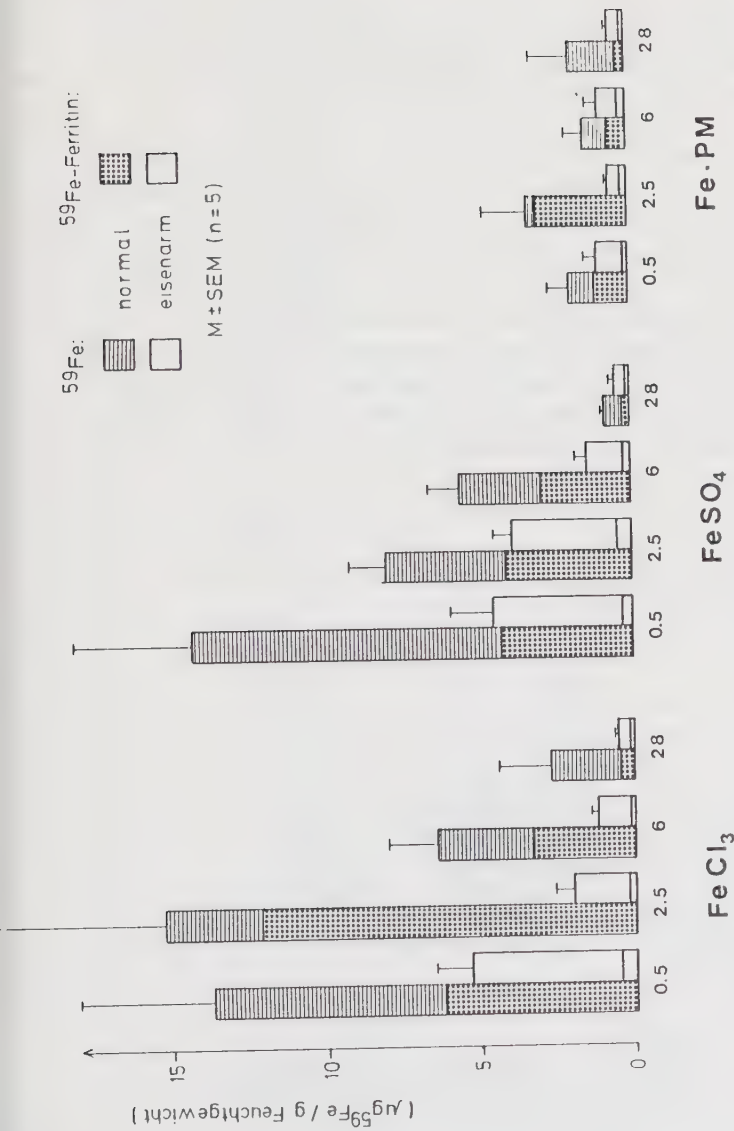


Abb. 15

⁵⁹Fe-Aufnahme in die Duodenalmukosa eisenarmer und normaler Ratten. Der innerhalb einer Säule dunkler schraffierte ⁵⁹Fe-Anteil stellt die Menge ⁵⁹Fe dar, die in die Ferritinfraktion des Gewebes aufgenommen wurde. Die Werte der einzelnen Versuchsserien sind im Anhang H, Tabelle A3, die statistische Auswertung in Tabelle II, III zu finden.
 Ordinate: Konzentration $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g}$ Mukosafeuchtgewicht
 Abszisse: Versuchsdauer in Stunden

C. 4.5.2. Spezifischer ^{59}Fe -Einbau in duodenales Mukosaferritin
eisenarmer und normaler Ratten

Beim Einbau von ^{59}Fe in mukosales Ferritin konnte bei den normalen Tieren eine generell höhere Einbaurrate festgestellt werden, als bei den eisenarmen. Der zeitliche Verlauf (Abb. 16) zeigt in beiden Tiergruppen einen hohen Einbau zu frühen Zeitpunkten (0,5; 2,5 h), gefolgt von einem starken Abfall (28 h). Hierbei verhielten sich die beiden Eisensalze sehr ähnlich, dabei wurde aus dem Eisenpolymaltosekomplex weniger ^{59}Fe eingebaut. Der Einbau von Eisen pro Ferritineinheit (spezifischer Einbau) in das Mukosaferritin eisenarmer Tiere betrug im Mittel 13% des Wertes von normalen Tieren.

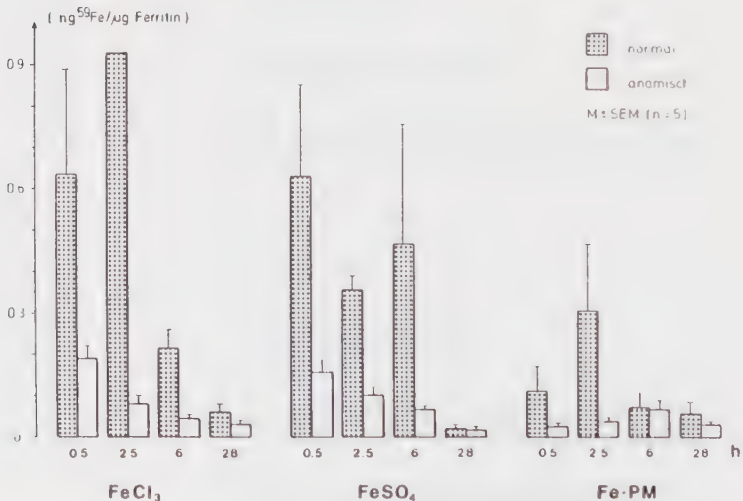


Abb. 16

^{59}Fe -Einbau in duodenales Mukosaferritin eisenarmer und normaler Ratten nach den verschiedenen Versuchszeiten. Die Werte der Versuchsreihe sind in Tabelle A2, die statistische Auswertung in Tabelle IV zusammengefaßt.

Obwohl Daten zum Eisengehalt von Ferritin in den verschiedenen Organen vielfältig erstellt wurden, untersuchte unseres Wissen bisher niemand die Kinetik der spezifischen Postabsorption der ^{59}Fe -Beladung des Proteins in der Duodenalmukosa und der Leber.

C. 4.6.1. Aufnahme von ^{59}Fe in die Leber normaler und eisenarmer Ratten

Die ^{59}Fe -Aufnahme des Lebergewebes zeigt im Vergleich zu derjenigen der Mukosa ein umgekehrtes Bild. Bei allen Eisenverbindungen bauten die eisenarmen Tiere mehr ^{59}Fe in das Lebergewebe ein, als die normalen. Dieser Mehreinbau betrug im Mittel über 100% (Abb. 17). Dabei ist ein schnelles Anfluten des Eisens von $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ zu sehen. FeCl_3 und FeSO_4 erreichen ihre höchsten Werte zwischen 2,5 und 6 h. Das ^{59}Fe aus dem Eisenpolymaltosekomplex hingegen zeigte einen kontinuierlichen Anstieg. Vergleicht man die 28 h-Werte von $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$, $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ mit $^{59}\text{Fe-FePM}$, so erreicht der Eisenpolymaltosekomplex nach 28 h ca. 50% des Einbaus der ^{59}Fe -Radioaktivität der Eisensalze.

Der Anteil des Eisens, welcher in die Leberferritinfraktion eingebaut wird, ist bei den normalen Tieren höher als bei den eisenarmen. Relativ zu dem Gesamteiseneinbau in das Gewebe nimmt der Ferritineisenanteil bei den normalen Tieren über den Beobachtungszeitraum deutlich zu, während bei den eisenarmen Tieren für die Fraktion ein Abfall nach 28 h zu beobachten ist.

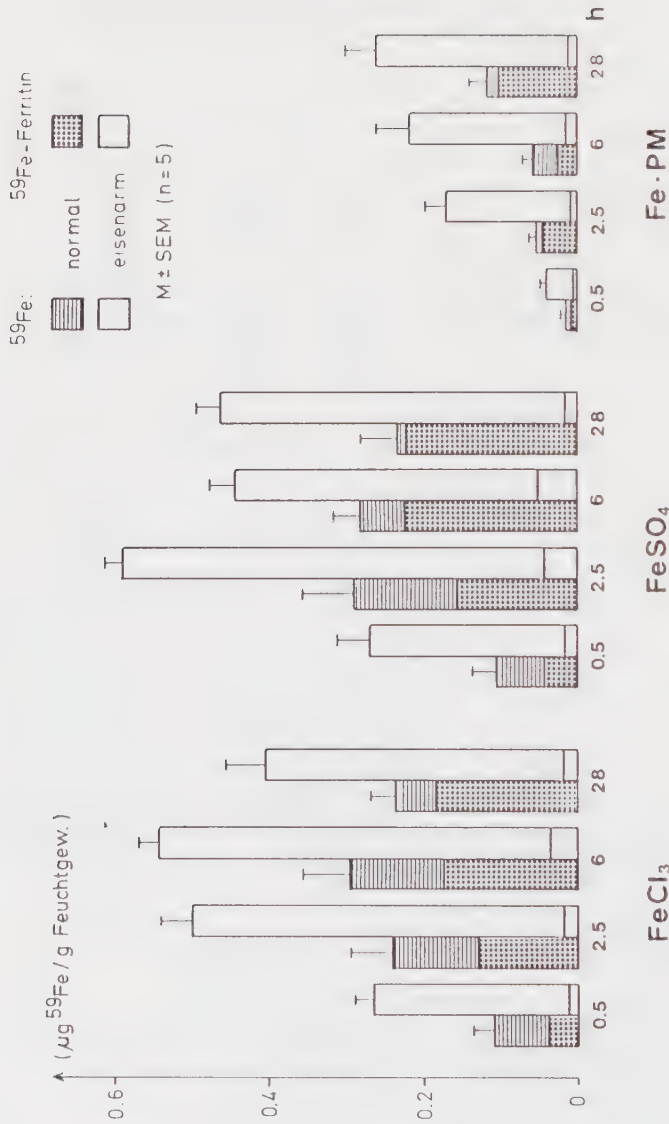


Abb. 17

Aufnahme von ^{59}Fe in die Leber eisenarmer und normaler Ratten, der innerhalb einer Stunde dunkler schraffierte ^{59}Fe -Anteil stellt die Menge ^{59}Fe dar, die in die Ferritinfraktion des Gewebes aufgenommen wurde. Tabelle M4 (im Tabellenanhang H) enthält die Werte der Versuchsreihen, die statistische Auswertung ist Tabelle V, VI zu entnehmen.

C. 4.6.2. Spezifischer Einbau von ^{59}Fe in das Leberferritin normaler und eisenarmer Ratten

Der ^{59}Fe -Einbau pro Ferritineinheit (spezifischer Einbau) in Leberferritin eisenarmer Tiere war höher als der in das der Kontrolltiere. Dabei war der zeitliche Verlauf des Einbaus von $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ äußerst ähnlich.

Bei den eisenarmen Tieren erreichte der Einbau aus FeCl_3 und der aus FeSO_4 sein Maximum nach 2,5 - 6 Stunden.

$^{59}\text{Fe-Fe(III)-PM}$ -Werte eisenarmer Tiere waren im Vergleich zu den Eisensalzen niedriger und erreichten nach 28 Stunden etwa die Hälfte des Wertes der Eisensalze. Die Einbaurrate der normalen Tiere war weitaus geringer, die mit dem Eisenpolymaltosekomplex behandelten Kontrolltiere zeigten den geringsten Einbau.

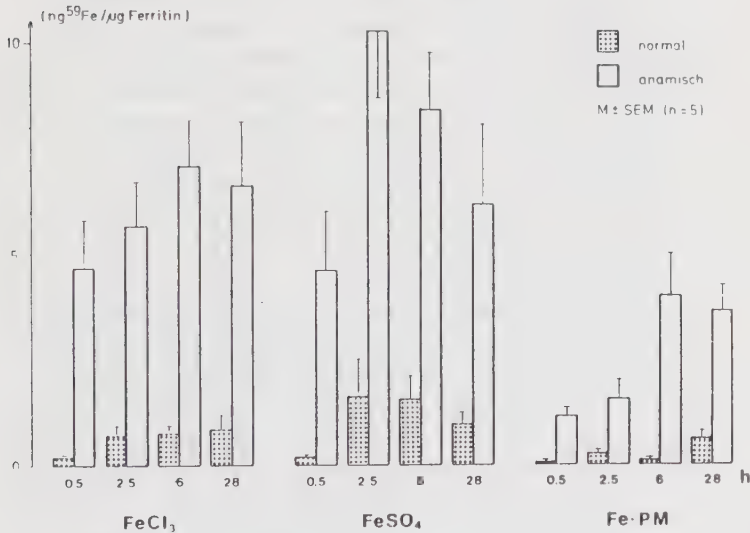


Abb. 18

Einbau von ^{59}Fe in Leberferritin eisenarmer und normaler Ratten nach einer Einzeldosis verschiedener ^{59}Fe -Eisenverbindungen. Die Einzelwerte der Versuchsergebnisse sind aus Tabelle A5, die statistische Auswertung Tabelle VII zu entnehmen (s. Tabellenanhang II).

C. 4.7. Zeitlicher Verlauf der ^{59}Fe -Verteilung im Vollblut
normaler und eisenarmer Ratten

Die Eisenaufnahme und Verteilung in Abhängigkeit von der Zeit wurde im Vollblut, Plasma, in den Blutzellen und der Hamfraktion der Blutzellen über die Messung der ^{59}Fe -Radioaktivität bestimmt. Sowohl bei normalen als auch bei eisenarmen Ratten konnte ein biphasischer ^{59}Fe -Radioaktivitätsverlauf im Gesamtblut beobachtet werden.

Aus Abb. 19A geht hervor, daß die normalen Tiere das Eisen in einer ersten sehr raschen und in einer zweiten langsamen Phase aufnehmen. $^{59}\text{Fe}\text{-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe}\text{-FeSO}_4$ zeigen dabei einen sehr ähnlichen Verlauf; nach 30 Minuten ist das Maximum der ersten Phase und nach 6 Stunden beobachtet man den Anstieg der zweiten Phase. Nach Verabreichung des ^{59}Fe -Eisenpolymaltosekomplexes zeigt sich bei beiden Phasen ein geringer Anstieg. Die ^{59}Fe -Aufnahme in das Gesamtblut bei den eisenarmen Tieren verläuft, wie schon erwähnt, ebenfalls biphasisch, erreicht aber höhere Werte. Der 30-Minutenwert von $^{59}\text{Fe}\text{-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe}\text{-FeSO}_4$ war dreimal höher als der des $^{59}\text{Fe}\text{-Fe-PM}$ -Wertes. Der Anstieg der zweiten Phase wurde ebenfalls nach 6 Stunden deutlich, war jedoch sehr viel steiler und betrug das 5-fache der Normalwerte (bei der Eisenpolymaltose das Doppelte).

Beobachtet man den ^{59}Fe -Plasmaeisenverlauf (Abb. 19B) der normalen und eisenarmen Tiere, so ist eine große Ähnlichkeit bei den Zeitpunkten 0,5 und 2,5 Stunden zu sehen. Nach 6 Stunden Versuchsdauer erfolgt ein starker Abfall, der bis zum 28 h-Wert anhält. Die ^{59}Fe -Plasmaeisenkonzentration nach 0,5 und 2,5 h Versuchszeit sind in beiden Testgruppen genauso hoch wie die entsprechenden ^{59}Fe -Bluteisenwerte.

Das ^{59}Fe -Blutzelleisen (Abb. 19C) zeigt einen kontinuierlichen Verlauf über die gesamte Versuchsdauer. Der Anstieg ist jedoch steiler als bei den eisenarmen Tieren. Die 28 h-Werte der ^{59}Fe -Blutzelleisenkonzentration der normalen

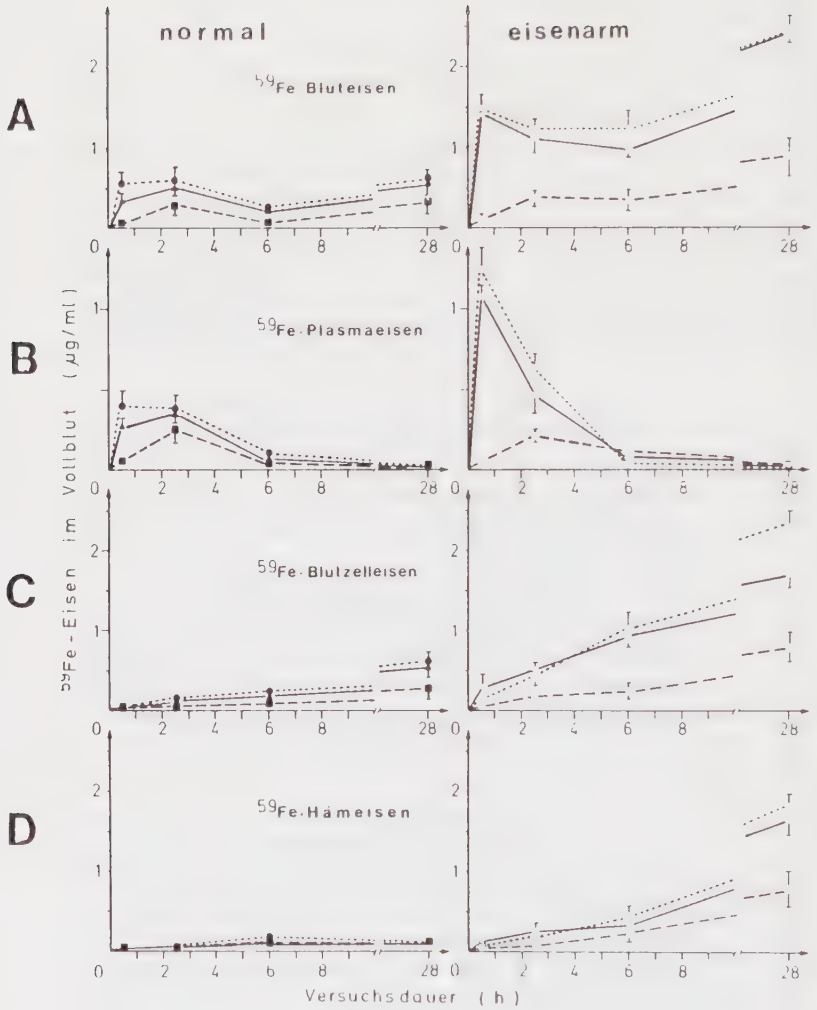
und eisenarmen Tiergruppe sind identisch mit den ^{59}Fe -Bluteisenwerten.

Am Versuchsende enthielten die Blutzellen eisenarmer, mit FeSO_4 behandelter Ratten einen 5-fach höheren, mit FeCl_3 und Fe-PM behandelten einen 3-fach höheren Wert als ihre jeweiligen Kontrollen, wobei FeSO_4 dreimal, FeCl_3 eineinhalbmal höhere Werte gegenüber dem Eisenpolymaltosekomplex betrug. Die Kinetik der ^{59}Fe -Derivate zur Hämoglobinsynthese (Abb. 19b) verläuft ähnlich dem ^{59}Fe -Blutzelleisen (Abb. 19c).

In diesen Versuchen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen ^{59}Fe - FeCl_3 und ^{59}Fe - FeSO_4 der Kontrolltiergruppe festgestellt werden.

Der Verlauf bei den eisenarmen Tieren ergab ein ähnliches Bild wie beim ^{59}Fe -Blutzelleisen, einen unwesentlichen Unterschied bei der Utilisation des dreiwertigen und zweiwertigen Eisensalzes, jedoch um einen zweieinhalbmal höheren Faktor gegenüber der Eisenpolymaltose. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigt, daß die eisenarmen Tiere bedeutend mehr ^{59}Fe im Blut transportieren. Bei der Fraktionierung des Blutes in Plasma, Blutzelleisen und Häm Eisen sind diese erhöhten Werte verfolgbar.

Die Aufschlüsselung des Verlaufs von angebotenem ^{59}Fe verfolgte das Ziel die zeitliche Abhängigkeit der verschiedenen Eisenderivate in den Blutkompartimenten zu verfolgen, um daraus Rückschlüsse auf deren Verfügbarkeit für die Hämoglobinsynthese zu erhalten.



▲ FeCl₃ △
 normal ● FeSO₄ ○ eisenarm
 ■ Fe-PM □

Abb. 19

Zeitlicher Verlauf der ⁵⁹Fe-Verteilung im Vollblut normaler und eisenarmer Ratten nach einer oralen ⁵⁹Fe-Eisendosis. Die Einzelwerte der Versuchsreihe sind Tabelle A8 - A11 zu entnehmen. Ordinate: ⁵⁹Fe-Eisen (µg/ml bezogen auf 1 ml Vollblut)

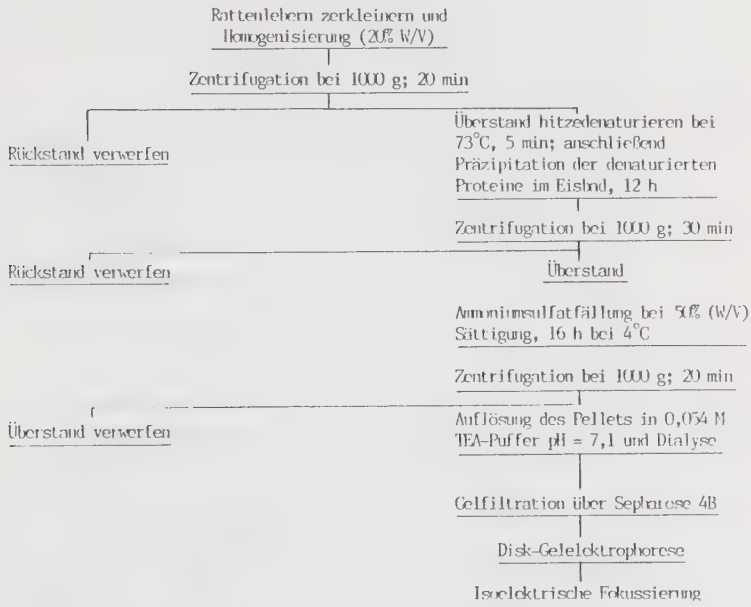
A) ⁵⁹Fe-Bluteisen
B) ⁵⁹Fe-Plasmaeisen

C) ⁵⁹Fe-Blutzelleisen
D) ⁵⁹Fe-Hämeisen

D. EXPERIMENTELLER TEIL

D. 1. Präparation von Ferritin

Die Verfahren zur Gewinnung und Reinigung von Ferritin gehen auf die grundlegenden Arbeiten von Harrison et al (1) und Arosio et al (2) zurück. Im wesentlichen wurde Ferritin in Anlehnung an die Arbeit von Hübers et al (3) isoliert. Die einzelnen Präparationsschritte sind in Form eines Flußdiagrammes in Schema I aufgeführt.



Schema I

D. 1.1. Homogenisierung und Hitzedenaturierung

Für die Isolierung von Ferritin wurden die Lebern von weiblichen Sprague-Dawley Ratten, Körpergewicht: 200 - 250 g (Zuchttiere der Süddeutschen Versuchstierfarm GmbH & Co KG, Tuttlingen) verwendet.

Nach einer groben Zerkleinerung von 10 Lebern (Gewicht: 70 g) wurden die Gewebestücke durch einen Fleischwolf gedreht und in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Die Homogenisierung erfolgte in einem Ultraturrax (Modell FMB Tornado, Fa. Emmendinger Maschinenbau) mit maximaler Umdrehung (2200 U/min).

Danach wurde das Homogenat zentrifugiert (1000 g, 20 min), das anfallende Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde einer Hitzedenaturierung (73°C, 5 min) in einem Wasserbad unterworfen. Dieses Gemisch wurde rasch im Eisbad abgekühlt und 12 Stunden darin stehen gelassen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1000 g, 20 min ergab eine gute Abtrennung der hitzedenaturierten Proteine aus dem fuchsroten Überstand.

D. 1.2. Ammoniumsulfatfällung

Als weiterer Anreicherungs-schritt folgte die Ammoniumsulfatfällung. Dabei wurde zum klaren Überstand festes Ammoniumsulfat hinzugegeben, bis eine 50 %ige Salzlösung von einem pH = 4,9 vorlag. Dieses Gemisch wurde 16 h bei 4°C stehen gelassen. Der darauf folgende Zentrifugationsschritt (1000 g, 20 min) trennte das ausgefällte Ferritin von anderen Verunreinigungen ab. Das Pellet wurde im Dialysepuffer (0,054 M Triethanolamin-Puffer, pH = 7,1) aufgelöst und gegen diesen Puffer dialysiert. Die weitere Analyse dieser Proteinlösung erfolgte per Gelfiltration.

D. 1.3. Gelchromatographie von Rattenleberferritin

a) Präparative Gelchromatographie

Das im Elutionspuffer (0,054 mol/l Triethanolamin-HCl pH = 7,0) equilibrierte, entgaste Gel (Sepharose 4B) wurde in eine Glas-säule ($\emptyset$ 5 x 100 cm) gegossen. 30 ml der klaren Proteinlösung (voher gegen denselben Puffer dialysiert) wurden auf die Säule aufgetragen und mit einer Flußgeschwindigkeit von 40 ml/h eluiert. Es wurden Fraktionen von 13 ml gesammelt. Das Elutionsprofil wurde durch UV-Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Die Ferritinfraktion, leicht an der braunen Farbe erkennbar, wurde gesammelt, gegen den Disk-Elektrophoresepuffer (s. D. 1.4.) dialysiert und in der Amiconzelle mittels Ultrafiltration (Diaflo XM - 100 Filter, Amicon, Lexington U.S.A) auf 1/3 des Volumens eingengt. Eine anschließende Zentrifugation (1000 g/20 min) trennte denaturierte Bestandteile ab.

b) Analytische Gelchromatographie

Sepharose 6B wurde im Elutionspuffer (0,054 mol/l Triethanolamin-HCl pH = 7,0) equilibriert, entgast und zur Packung in einer Chromatographie-Säule ($\emptyset$ 0,9 x 80 cm) verwendet. Als Reverenzsubstanzen zur Ermittlung des Molekulargewichtes wurden Dextran Blau 2000, Kaninchenmyosin, Rinderserumalbumin, Katalase und Aldolase zusammen mit Rattenleberferritin aufgetragen. Die Flußgeschwindigkeit betrug 8 ml/h und die Proteine wurden bei 280 nm durch ihre UV-Absorption registriert (4).

c) Elutionsparameter

Das Elutionsvolumen V_e charakterisiert das Verhalten eines Stoffes bei der Gelchromatographie. V_e ist abhängig vom Verteilungsverhältnis zwischen der mobilen Phase V_o (= outer volume) des Stoffes und der immobilen Phase V_i (= inner volume) der Gelpartikel. Dies ist für jedes Gel eine bestimmte Stoffkon-

stante.

Laurent und Killander (5) führten die Konstante K_{av} (av = available) ein, da die V_i - Bestimmung ungenau ist. Anstelle von V_i , dem inneren Volumen der Gelphase wird V_t , das Gesamtvolumen verwendet.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (11, 12)$$

Das Gesamtvolumen setzt sich aus dem gesamten Gelbett und dem Ausschlußvolumen V_o zusammen. V_o läßt sich ganz einfach mit einer hochmolekularen Substanz ermitteln (z.B. Dextran Blau 2000) da diese nicht in Gelporen eindringen kann. Streng genommen gilt der K_{av} - Wert nur für globuläre Proteine, da hier der Stokessche Radius eine Rolle spielt (s. Zit. Killander).

Trägt man halblogarithmisch die Molekulargewichte von bekannten Proteinen gegen ihre K_{av} - Werte auf, so erhält man eine Gerade, von der man aufgrund des K_{av} - Wertes von Ferritin auf dessen Molekulargewicht schließen kann (12, 13).

D. 1.4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

a) Disk-Gelelektrophorese

Elektrophoretische Trennungen wurden nach den Angaben von Gabriel (7) vorgenommen. Ein 7,5 %iges Polyacrylamid-Trenngel wurde in einem 0,1 M Tris-Glycin-Puffer pH = 8,3 verwendet. Die Maße der zylindrischen Glasröhrchen waren a) 1,5 x 13 cm für den präparativen und b) 0,6 x 10 cm für den analytischen Lauf. Die Betriebsspannung wurde im Fall a) 10 min auf 50 V, danach auf 100 V gehalten (10 mA/Gel; laufzeit ca. 6 h) und im Fall b) auf 70 - 100 V eingestellt (4 mA/Röhrchen). Bei dem präparativen Disk-Gelelektrophoreselauf wurden bis zu 2 ml Proteinlösung (12 mg Protein/ml) aufgetragen.

Nach ca. 4 Stunden Laufzeit hatte sich die braune Ferritinbande in einer schmalen Zone konzentriert. Durch diesen Reinigungsschritt konnten hauptsächlich niedermolekulare Verunreinigungen (Hämoglobinreste) vom Ferritin abgetrennt werden. Die rotbraunen Ferritinbanden wurden nach der präparativen Auftrennung herausgeschnitten (2). Bei der analytischen Elektrophorese wurden die Proteinbanden mit 12,5% Trichloressigsäure 20 Minuten lang fixiert und mit einer 1 %igen Amidoschwarzlösung in einem Gemisch aus Methanol, Eisessig und H_2O (3 : 1 : 5) angefärbt. Entfärbt wurde in einem Gemisch aus Ethanol, Eisessig und H_2O (3 : 1 : 5).

D. 1.4. b) SDS-Gelelektrophorese

Das Verfahren der SDS-Gelelektrophorese geht auf Weber und Osborn zurück (8, 9, 10). Die Flachgelmodifikation wurde von Laemmli beschrieben (11).

Das hierfür verwendete Sammelgel war ein 5 %iges (1,6 ml Acrylamid Stammlösung; 2 ml Sammelgelpuffer, 6 ml H_2O ; 3 μ l TEMED; 10 mg Ammoniumpersulfat) das Trenngel ein 12 %iges Polyacrylamidgel (Acrylamid Stammlösung 12 ml, Trenngelpuffer 6 ml, H_2O 12 ml, TEMED 10 μ l, Ammoniumpersulfat 30 mg).

Alle verwendeten Puffer (Proben-, Trenngel-, Sammelgel- und Elektrodenpuffer) wurden aus der oben zitierten Literaturquelle entnommen.

Die zu untersuchenden Proteinproben ($c = 50 - 100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden mit dem Probenpuffer gemischt, 3 Minuten lang aufgekocht und anschließend zentrifugiert (1000 g, 5 min).

Bedingungen der SDS-Elektrophorese:

Anfangswerte:	120 V; 95 mA
Endwerte	: 250 V; 45 mA
Laufzeit	: ca. 6 h; RT

Die Gele wurden 30 Minuten in einem Gemisch von Isopropanol/Eisessig/H₂O (2,5 : 1 : 10) fixiert und 30 Minuten mit einer 1 %igen wässrigen Coomassie Blue Lösung angefärbt.

Die überschüssige Farbelösung wurde im Entfarbebad von Methanol/Eisessig/H₂O (2,5 : 3,5 : 2,0) ausgewaschen.

Aus der Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel wurde auf ihr Molekulargewicht geschlossen (8).

D. 1.5. Präparative Isoelektrische Fokussierung

Die braune Ferritinbande der präparativen Disk-Gelelektrophorese wurde herausgeschnitten, zerkleinert, in einem Potter-Elvehjem mit 0,054 M TEA-Puffer pH = 7,1 homogenisiert und bei 1000 g, 20 min lang zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung aufgearbeitet.

Dazu verwendeten wir eine Fokussiersäule von 110 ml (LKB Modell 8100, Bromma Schweden).

Die Ferritinlösung (c = 0,5 mg Protein/ml), gemessen per Lowry (17) wurde in einem linearen Saccharosegradienten (5 - 50%) mit Hilfe einer Ampholytlösung (Ampholine von LKB, Bromma Schweden) fokussiert. Pro Ansatz lassen sich 50 ml Proteinlösung aufarbeiten. Die benötigten Anoden- und Kathodenlösungen wurden der LKB Application Note 219 (14) entnommen. Dem Versuchsablauf lag die Arbeit von Haglund (15) und die LKB Application Note 194 (16) zugrunde.

Ampholine:	pH 4 - 6 und pH 5 - 7
Polung :	Kathode oben, Anode unten
Dauer :	18 h bei maximal 1600 V

Nach Beendigung der Fokussierung wurden die getrennten Proteine in einem Fraktionssammler (Modell LKB 2112 Radirac) fraktioniert (2,5 ml). Die UV-Absorption wurde bei 280 nm gemessen und über einen Colora-Schreiber aufgezeichnet.

Zur Kontrolle des pH-Gradienten wurde der pH-Wert der einzelnen Fraktionen mit einem pH-Meter gemessen. Die Ferritinfraktionen wurden über Nacht gegen einen 0,054 M TEA-Puffer pH = 7,1 dialysiert und wiederum in der Amiconzelle (Diaflo Filter XM-100) eingengt.

Die durchschnittliche Gesamtausbeute von 10 Rattenlebern betrug ca. 3 - 5 mg Ferritin.

D. 1.6. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Lösungen wurde nach dem Verfahren von Lowry et al (17) durchgeführt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (Fraktion V, Fa. Sigma München). Auch hochreines Ferritin, wie es für die Standardisierung des RIA's eingesetzt wurde, läßt sich per Lowry bestimmen.

Wie Worwood (18) und das Internationale Komitee für Standardisierung der Hämatologie (19) feststellten, gibt es eine sehr gute Übereinstimmung der Ferritinbestimmung per Lowry und der Berechnung des Proteingehaltes aus der Aminosäurezusammensetzung von Humanferritin.

D. 2. Bestimmung des Hämoglobingehaltes und des Hämatokritwertes

D. 2.1. Hämoglobingehalt

Zur Hämoglobinbestimmung (Hb-Wert) im Blut wurde der Mercko-Test Nr. 3317 (der Fa. Merck) verwendet.

D. 2.2. Bestimmung des Hämatokritwertes

Vollblut wird in ein heparinisiertes Mikro-Hämatokrit-Röhrchen (Fa. Brand, Kat. Nr. 749316) aufgenommen und 15 Minuten zentrifugiert. Der Hämatokritwert (Hk), d.h. der prozentuale Anteil der Erythrocyten am Blutvolumen wird anhand einer Skala abgelesen.

D. 3. Bestimmung von Eisen im Serum und der Eisenbindungskapazität

Für die Serumeisenbestimmung wurde der Reagenziensatz des Mercko-Tests 3307, für die Eisenbindungskapazität der Mercko-Test 3313 (der Fa. Merck) benutzt.

D. 4. Immunchemische Verfahren

D. 4.1. Immunblot

Der Immunblot-Assay nach der Methode von Hawks et al (20) wurde mit einem Testkit der Fa. BIO-RAD (Immunblot^R Kit mit Goat Anti-Rabbit (GAR) Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate BIO-RAD Deutschland) erstellt.

Bei diesem Verfahren wird das Antigen (Ferritin) in verschiedenen Konzentrationen von 1,5 - 100 ng/1 µl auf einen Nitrozellulosestreifen aufgetragen. Freie Bindungsstellen auf der Folie wurden mit einem 3 %igen Gelatine-Tris-NaCl-Puffer pH = 7,5 (20 mM Tris, 500 mM NaCl) blockiert. Danach wurde der Antikörper (Anti-Ferritin) in einer Konzentration von 0,5 mg IgG/20 ml hinzugegeben und 4 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang wurde das Ziegen-Antikaninchen-IgG-Konjugat (Meerrettichperoxidase gekoppelter Antikörper) zupipettiert. Das Entwicklerreagenz 4-Chlor-1-naphthol (Substrat für Peroxidase) wurde hinzugegeben. Anhand der Farbintensität dieser Reaktion konnte semiquantitativ die Güte des Antiserums erkannt werden.

D. 4.2. Doppeldiffusionstests

a) Ouchterlony-Test

Eine weitere wichtige qualitative Methode zur Untersuchung gewonnener Antikörper war der Ouchterlony-Test (21). Es wurde ein 1 %iges Agargel mit 0,015 M Veronalpuffer pH = 8,6 ange-setzt und 10 ml davon in eine Petrischale (Ø 8,5 cm) gegossen. Im Abstand von 1 cm um ein Zentralloch wurden 6 - 8 Löcher

(ϕ 6 mm) gestanzt, die jeweils maximal 30 μ l Probenlösung faßten.

b) Modifizierter Ouchterlony-Test

Die Bestimmung des optimalen Antikörper/Antigenverhältnisses per Geldiffusion geht auf Everhart (22) und Nowotny (23) zurück. Bei der Versuchsanordnung wurde das Antigen (Anti-Ferritin, gereinigt nach D. 5.a) serienweise in Natrium-Phosphatpuffer pH = 7,2 verdünnt ((a) 1 : 50; (b) 1 : 25; (c) 1 : 10; (d) 1 : 3; (e) 1 : 2; (f) 1 : 1,5) und mit einer konstanten Antikörpermenge (10 μ l Antikaninchen-IgG, Kat. Nr. R-5001 der Fa. Sigma München) versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h bei 4°C wurden die Ansätze 15 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert. Antigen- bzw. antikörperhaltige Überstände konnten anschließend in einem Doppeldiffusionstest (Gel s. D. 4.2.) ermittelt werden.

Abb. 20 zeigt das Ergebnis des Diffusionstests, wobei in B) jeweils 20 μ l der Überstände in, A) 20 μ l der Antikörperlösung und in C) 20 μ l der Antigenlösung aufgetragen wurde.

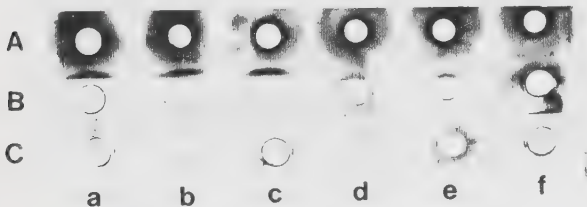


Abb. 20

Bestimmung des optimalen Antigen/Antikörperverhältnisses per Geldiffusion nach Everhart (22) und Nowotny (23)

- A) 20 μ l der Antikörperlösung
- B) je 20 μ l der Überstände
- C) 20 μ l der Antigenlösung

- a) - d) Überstände ohne Antigen
- e) Äquivalenzpunkt: Überstände ohne Antigen und ohne Antikörper
- f) Überstand ohne Antikörper

D. 4.3. Immunelektrophoresen

Immunelektrophoretische Techniken mit antikörperhaltigen Gelen wurden in Anlehnung an Laurell (24), Carmal und Konjin (25) in 1 %igen Agarosegelen durchgeführt.

Als Elektrodenlösung wurde 0,06 M Veronalpuffer, pH = 8,6 verwendet, derselbe Puffer auf 0,015 M verdünnt wurde zur Gelherstellung benutzt.

a) Laurell-Rocket-Assay

Zu 15 ml einer 60°C heißen Agarlösung (1 %ig in 0,015 M Veronalpuffer pH = 8,6) wurde 0,15 ml Antiserum hinzugefügt.

(Versuche mit gereinigten Antiseren wurden analog ausgeführt).

Die auf die Glasplatte (10 x 10 cm) gegossene Agarlösung härtete auf einen Nivelliertisch aus. In das Gel wurden in ca. 2 cm Abstand Löcher (ϕ 4 mm) gestanzt, die eine Probenfüllmenge von 10 μ l fassen konnten.

Rattenleberferritin wurde in Konzentrationen von 0,1 - 1,5 μ g/ 10 μ l in die Löcher aufgetragen. Als Elektrophoresekommer wurde das LKB-Multiphor-Gerät eingesetzt. Die Spannung betrug 8 - 10 V/cm, die Laufzeit ca. 2 h.

b) Grabar-Williams-Immunelektrophorese

Eine weitere Modifikation der Immunelektrophorese ist die Methode nach Grabar und Williams (26). Die Versuchsbedingungen, Gele und Glasplatten sind dieselben wie beim Laurell-Rocket-Assay (D. 4.3.a), nur mit dem Unterschied, daß kein Antikörper ins Gel gegossen wird.

Die Antigenproben (Füllmenge: 10 μ l) werden zuerst der Elektrophorese unterworfen (Versuchsbedingungen und Dauer s. D.4.3.a). Danach wird eine rechteckige Rille aus dem Gel geschnitten und das Antiserum in diese Vertiefung gefüllt. Das Antigen wird über Nacht gegen den Antikörper diffundieren gelassen. Es entstehen

Präzipitin-Banden, wie Abb. 21 zeigt.

Der Hauptvorteil dieser Methode ist die größere Auflösung, die durch die Kombination von Elektrophorese und Doppeldiffusion zustande kommt.

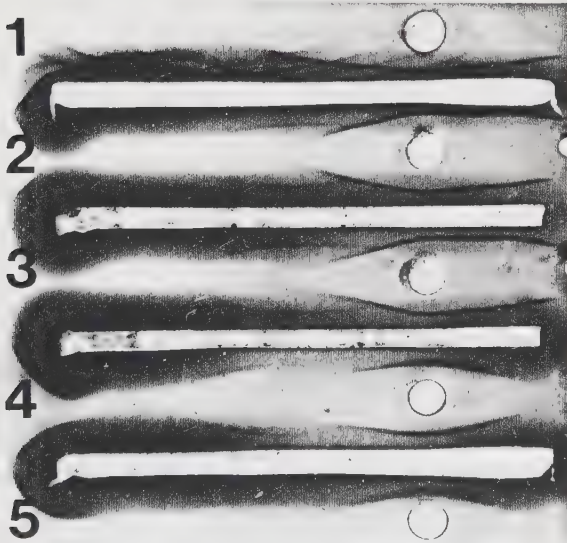


Abb. 21

Gräber-Williams-Immunoelektrophorese (26)

1. Affinitätschromatographie gereinigtes Kaninchen IgG (D. 5.b) gegen Ziegen-Antikaninchen serum (Kat. Nr. R-4751, Sigma München)
2. - 4. Ammoniumsulfatfällung von Kaninchenantisera, IgG-Fraktion (D. 5.a) gegen Ziegen-Antikaninchen serum (s. 1.)
5. Unspezifisches Kaninchen serum gegen Ziegen-Antikaninchen serum (s. 1.)

D. 4.4. Nachbehandlung der Präzipitate von Doppeldiffusionstests und Immunelektrophoresen

Um nicht präzipitierte Proteine aus den Gelen zu entfernen, wurden die Gelplatten in 0,0001 M Tris/HCl Puffer pH = 8,0 über Nacht gewässert, anschließend mit Filterpapier bedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Zur deutlicheren Erkennung der Präzipitate wurden die Gele mit 12,5 %iger Trichloressigsäure fixiert, schließlich mit einem Gemisch aus Coomassie Brilliant Blue G 250 (der Fa. Serva Deutschland) Ethanol, Eisessig und H₂O im Verhältnis 3 : 1 : 5 gefärbt. Entfärbt wurde mit einer Ethanol, Eisessig und H₂O Mischung (3 : 1 : 5).

D. 5. Isolierung von IgG aus Kaninchenantiserum

a) Ammoniumsulfatfällung

Die Reinigung von Kaninchenantisera sollte eine mögliche Kreuzreaktion von Kaninchenferritin mit Rattenferritin bei den immunologischen Bestimmungen ausschließen. Die Aussalzung von IgG aus Antiseren wurde zuerst von Brieger und Ehrlich (27) durchgeführt. Ein modifiziertes Verfahren der fraktionierten IgG-Präzipitation mittels Ammoniumsulfat wurde in dieser Arbeit nach Vorschrift von Hudson et al (28) durchgeführt.

b) Affinitätschromatographie mit Protein A Sepharose CL-4B

Protein A, ein Zelloberflächenantigen von *Staphylococcus aureus* bindet spezifisch die F_C - Region von Antikörpern der IgG-Klasse (29), ohne mit der antigenbindenden F(ab')₂ - Region in Wechselwirkung zu treten.

5 ml Kaninchenantiserum wurden über eine Protein A Sepharose CL-4B (Pharmacia Kat. Nr. P-3391) Säule (ø 2,5 cm, Bindungskapazität von 2 ml Gel betrug 40 mg IgG) gegeben.

Unspezifische Serumproteine wurden mit 0,15 M Natrium-Phosphatpuffer pH = 7,2 ausgewaschen und die IgG-Fraktion analog der Vorschrift von Hjelm (30) mit 1 M Essigsäure eluiert. Die gesammelte IgG-Fraktion wurde anschließend gegen 0,15 M Natrium-Phosphatpuffer pH = 7,2 dialysiert.

Der IgG-Titer von ammoniumsulfatgefälltem und affinitätschromatographisch gereinigten Antiseren wurden durch Radialimmundiffusion nach Mancini et al (31) bestimmt.

Als Reverenz wurde Kaninchen IgG (Kat. Nr. I-5006, Sigma München) verwendet. Die Antiserumkonzentration (Ziegen- Antikaninchen-serum Kat. Nr. R-4571, Sigma München) des Agargels (Herstellung s. D. 4.3.a) war 1 %ig.

Das ausgesaltzte IgG hatte eine Konzentration von 1,6 mg/ml, die über Protein A Sepharose gereinigte einen Titer von 6,5 mg/ml.

D. 6. Radiochemische Verfahren

D. 6.1. Iodierung von Ferritin

a) Chloramin T-Methode

Dieses Markierungsverfahren geht im wesentlichen auf die von Greenwood et al (32) beschriebene Methode unter Berücksichtigung neuerer Arbeiten (33, 34) zurück.

Rattenleberferritin (15 µg) wurde in 100 µl 0,2 M Natrium-Phosphatpuffer pH = 7,2 gelöst und 24 h bei 4°C gegen 5000 ml dieses Puffers dialysiert, um sicher zu sein, daß keine reduzierenden Substanzen im Reaktionsansatz verbleiben.

Alle Lösungen wurden mit 0,2 M Natrium-Phosphatpuffer pH = 7,2 hergestellt.

0,5 mCi Na¹²⁵I (Kat. Nr. NEZ 033A; NEN, Dreieich) einer spezifischen Aktivität von (17,4 mCi/mg) wurden mit 50 µl Puffer versetzt. Dialysiertes Ferritin (ca. 150 µl) wurde mit 20 µl einer Lösung von 2 mg/ml Chloramin T (Fa. Merck, Art. 2426) versetzt und 90 Sekunden bei Raumtemperatur reagieren gelassen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Natriumdisulfit (Fa. Merck, Art. 6528), 40 μ l einer Konzentration von 4 mg Natriumdisulfit/ml abgestoppt. ^{125}I -markiertes Ferritin wurde per Gelchromatographie von ungebundenem Iod abgetrennt. Hierzu Sepharose 6B (Pharmacia Schweden) mit einem 0,15 M Natrium-Phosphatpuffer pH = 7,4, in dem 1 g/l Rinderserumalbumin (Kat. Nr. A-7030, Sigma München) und 1 g/l Natriumazid (Fa. Merck, Art. 6688) gelöst waren, equilibriert und in eine Säule (ϕ 2; 80 cm) gefüllt. Die Flußgeschwindigkeit betrug 6 ml/h, es wurden 1,5 ml Fraktionen gesammelt.

b) Iodogen-Methode

Iodogen (1,5-Diphenyl-2, 4, 6, 8-tetrachlor-2, 4, 6, 8-tetraazabicyclo-3. 3. 0. octan-3, 7-dion) ist ein mildes Oxidationsmittel. Da es praktisch unlöslich in wässrigen Lösungen ist, wird dieses Reagenz auf einer festen Phase (Reagenzglas) abgetrennt. Die spezifische Aktivität des markierten Produkts soll geringer sein, als bei der Chloramin T-Methode. Ein Vorteil kann jedoch die geringere Zerstörung des Proteins beim Markierungsvorgang sein (35). Dieser Markierungsmethodik liegt die Arbeit von Fraker und Speck (35) zugrunde.

Das markierte Ferritin wurde analog den Bedingungen der Chloramin T-Markierung per Gelfiltration isoliert.

D. 6.2. Markierung von IgG

Die ^{125}I -Markierung von IgG (Anti-Ferritin) wurde nach der Chloramin T-Methode analog zu der Rattenferritinmarkierung durchgeführt. Das ^{125}I -IgG wurde über eine Sephadex-G-50-Säule (ϕ 0,7; 50 cm) abgetrennt. Die Flußgeschwindigkeit betrug 10 ml/h, es wurden 1,6 ml Fraktionen gesammelt. Der Elutionspuffer war derselbe wie bei D. 6.1.a.

D. 6.3. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität ins Protein

Die Gesamtradioaktivität einer ^{125}I -markierten Proteinprobe enthält nicht nur kovalentgebundenes Iod am Protein, sondern auch freie Iodanteile. Dies liegt an der Unvollkommenheit der Markierung und der Abtrennungsmethode vom gebundenen zum freien Tracer. Deshalb ist es von Interesse (z.B. beim Radioimmunoassay), welcher Anteil ins Protein eingebaut ist. In Analogie zu der Vorschrift von Johnstone und Thorpe (36) wurden 20 μl der gesammelten ^{125}I -Proteinfraktion (^{125}I -Ferritin, bzw. ^{125}I -IgG) auf einen Glasfaserfilter (Fa. Whatman GF/B; ϕ 2,5 cm) pipettiert, trocknen gelassen und mit 2 ml 10 %iger Trichloressigsäure präzipitiert. Der ungebundene ^{125}I -Anteil wurde mit Ethanol ausgewaschen und die Probe anschließend im Gammaskpektrometer (Modell Prias, Fa. Beckman, U.S.A.) gezählt. Durchschnittlich waren 70 - 100% der Radioaktivität unserer Proben proteingebunden.

D. 6.4. Bestimmung der immunologischen Reaktivität der Elutionsfraktionen

Die immunologische Bestimmung des markierten Ferritins erfolgte nach Bolton et al (33).

Proben (ca. 4 - 6 ng mit ca. 10 000 cpm) der Elutionsfraktionen wurden mit einem Überschuß an Anti-Ferritin (Ammoniumsulfatfällung: c = 1,6 mg/ml, s. D. 5.a) versetzt. Nach einer Inkubationszeit bei 16 h bei 4°C wurden 20 μl (einer 1 : 5 Verdünnung) Ziegen-Antikaninchen-IgG (Kat. Nr. R-5001, Sigma, München) hinzugesetzt und nochmals 16 h bei 4°C reagieren gelassen. Die entsprechenden Präzipitate wurden im Gammaskpektrometer (Modell Prias, Fa. Beckman, U.S.A.) gezählt.

D. 6.5. Analytische Disk-Gelelektrophorese der markierten Proteine

Nach der Gelfiltration und näheren Charakterisierung (immunologische Reaktivität und Ausfällung mittels Trichloressigsäure) wurden die ferritinhaltigen Fraktionen einer

analytischen Disk-Gelelektrophorese unterzogen. Die Versuchsbedingungen, Gelzusammensetzung und Röhrchenmaße sind dem Abschnitt D. 1.4.a zu entnehmen. Die Gele wurden weder gefärbt, noch fixiert, sondern in 4 mm Abständen geschnitten. Der Gehalt an Radioaktivität jedes einzelnen 4 mm breiten Gelscheibchens wurde in einem Gammaskpektrometer (Modell Prias, Fa. Beckmann, U.S.A.) bestimmt.

D. 6.6. Quantitativer Präzipitationstest zur Ermittlung des optimalen Anti-IgG/IgG-Verhältnisses

Der heterologe Anti-Immunglobulin Kopräzipitationstest nach Minden und Farr (37) ist eine weitere Methode (22, 23) zur Bestimmung des optimalen Anti-IgG/IgG-Verhältnisses. Eine Tracermenge ^{125}I -IgG wird mit Anti-Ferritin-IgG (s. D. 5.b) gemischt, so daß eine Endkonzentration von 6000 cpm/20 μg Protein vorliegt.

Antikaninchen-IgG (Kat. Nr. R-5001, Sigma, München) wird wie vorgeschrieben mit 2 ml destilliertem Wasser rekonstituiert. (1 ml Anti-IgG präzipitiert 1,4 mg Kaninchen-IgG lt. Firmenangabe). Eine konstante Menge ^{125}I -IgG (6000 cpm/20 μg Protein) wird mit steigenden Volumina der Anti-IgG-Lösung (5; 10; 20; 30; 60; 80; 90 und 120 μl) versetzt und 16 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird 15 Minuten bei 10 000 g (Eppendorfzentrifuge, Modell 5412) abzentrifugiert. Das entstehende Präzipitat wird im Gammaskpektrometer gezählt.

D. 6.7. Radioimmunoassay von Ferritin

D. 6.7.1. Bestimmung der optimalen Anti-Ferritin-Menge für den RIA

Es ist wichtig, die genaue Antikörperversdünnung für den kompetitiven RIA herauszufinden, deshalb wird eine konstante Menge markiertes Ferritin mit verschiedenen Verdünnungen des Antikörpers (Anti-Rattenferritin aus Kaninchenserum, s. D. 5.a, Verdünnungsreihe 1 : 5 - 1 : 3125) inkubiert.

Die Reaktion wurde 16 h bei 4°C durchgeführt.

Das gebundene Antigen wird vom freien, mit der entsprechenden Verdünnung Antikaninchen-IgG (s. D. 6.6.) abgetrennt und die ^{125}I -Radioaktivität der gebundenen Fraktion im Gammaskpektrometer (Modell Prias, Fa. Beckmann, U.S.A.) bestimmt. Das danach erstellte Schaubild (Abb. 11) kann zur Bestimmung der im Test zu verwendenden Menge an Anti-IgG herangezogen werden (d.h. die Antikörperverdünnung, bei welcher 50 - 80% der max. Bindung erhalten werden, diese betrug bei unserem Antikörper die 1 : 250 Verdünnung).

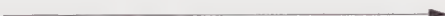
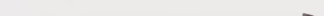
Diese Verdünnung sollte im kompetitiven Test verwendet werden, um sicherzugehen, daß die Bindungsstellen in limitierter Konzentration vorliegen.

D. 6.7.2. Erstellung der Standardkurve des RIA's

Die quantitative Bestimmung von Ferritin wurde mit Hilfe des Radioimmunoassays in Anlehnung an die Arbeiten von Luxton et al (37), Barnett et al (38) und Bolton et al (33) durchgeführt.

25 μl ^{125}I -markiertes Ferritin wurde in jedes Reagenzglas vorgelegt. Für die Erstellung der Standardkurve wurden 0; 2; 3; 5; 10; 15; 30; 50 und 100 ng/30 μl Rattenferritin hinzupipettiert. Anschließend wurde 25 μl Anti-Ferritin (s. D. 6.7.1.) hinzugegeben und die Lösungen 16 h bei 4°C reagieren gelassen. Außerdem wurden 2 Proben für die Bestimmung der unspezifischen Bindung angesetzt: ^{125}I -Ferritinmenge, wie oben beschrieben, 0 ng Ferritin und 100 ng Ferritin; jedoch statt Anti-Ferritin 75 bzw. 45 μl 4% BSA-PBS-Puffer pH = 7,2.

Folgendes Pipettierschema verdeutlicht den Versuchsansatz

	100%- Wert	Leerwerte									
^{125}I -Ferritin	25 μl										
Ferritin (ng/30 μl)	/	2	3	5	10	15	30	50	100	/	100
Anti-Ferritin 1 : 250 Verd.	25 μl									/	/
4% BSA-PBS Puffer pH = 7,2	30 μl	/	/	/	/	/	/	/	/	75 μl	45 μl

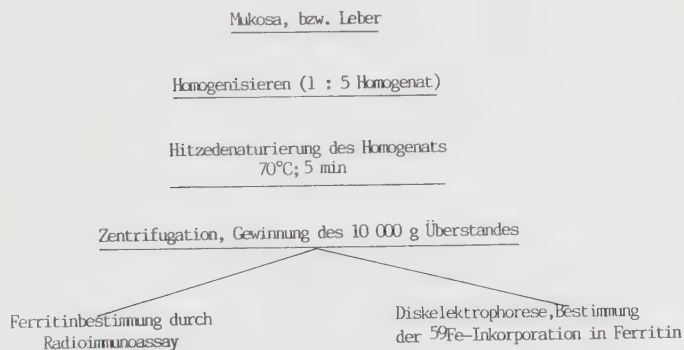
Die Abtrennung des gebundenen Ferritins vom freien erfolgte durch Zugabe von 50 μl einer 1 : 250 Verdünnung Antikaninchen-IgG (Kat. Nr. R-5001, Sigma, München) die Reaktionsbedingungen waren wiederum 16 h bei 4°C.

Nach Beendigung der Reaktionszeiten wurden die Reagenzgläser 15 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, Modell 5412), die Überstände abpipettiert und die ^{125}I -Radioaktivität der Präzipitate im Gammasepektrometer (Modell Prias, Fa. Beckmann, U.S.A.) bestimmt.

D. 7. Gewinnung und Aufarbeitung von Mukosa- und Leberhomogenaten

Das mit 10 ml eiskalter, physiologischer Kochsalzlösung gespülte Darmsegment wurde sofort vorsichtig auf einem Filterpapier abgetupft und nach Messung seiner Länge (durchschnittlich 10 cm) in ein eisgekühltes Becherglas zur Bestimmung der

Gesamtaktivität gegeben. Danach ließ sich die Mukosa durch Abstreifen des Segments auf einer eisgekühlten Glasplatte gewinnen. Das Mukosamaterial (durchschnittliches Gewicht 0,7 g) wurde in 2,8 ml eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und in einem Potter Elvehjem Homogenisator (Fa. Braun, Melsungen) von 15 ml Fassungsvermögen 3 Minuten lang (1000 U/min und 3 Hübe/min) homogenisiert. Der anschließende Hitzedenaturierungsschritt (5 min bei 70°C) erfolgte in Anlehnung an Linder und Munro (39). Zur Abtrennung der festen, koagulierten Partikel wurde in einer Eppendorffzentrifuge (Modell 5412) 15 Minuten bei 4°C und 10 000 g zentrifugiert. Ein Teil des klaren Überstandes wurde für die Ferritingehaltsbestimmung per RIA verwendet (Ka. C. 4.1.). Ein anderer Teil für die Bestimmung der ^{59}Fe -Inkorporation ins Ferritin (Ka. D. 8.). Die Homogenisierung der Leber erfolgte in einem Waring Homogenisator (3 min bei max. Umdrehung). Auch hier wurde mit eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung ein 1 : 5 Homogenat hergestellt (Schema II verdeutlicht diesen Ablauf).



Schema II: Darstellung der Gewebearbeitung (Mukosa und Leber)

D. 8. Bestimmung des ^{59}Fe -Einbaus in Gewebeferritin

Im folgenden Text als "spezifischer Einbau von ^{59}Fe in Ferritin" beschrieben.

Dies erfolgte mittels Polyacrylamid-Disk-Gelelektrophorese. 200 μl der hitzedenaturierten Gewebeüberstände wurden auf die zylindrischen Gelröhrchen ($\varnothing$ 0,5; 9 cm) aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt.

Puffer, Trenngelkonzentration und Elektrophoresebedingungen sind Kapitel D. 1.4.a zu entnehmen. Nach der Probenauftrennung wurden die Gele in 4 mm breite Gelstückchen geschnitten und im Gammaskpektrometer (Modell Prias, Fa. Beckmann, U.S.A.) gezählt. Das Radioaktivitätsprofil der Elektrophoresen (Abb. 22) zeigte auf der Höhe des Ferritins (Wanderungsstrecke, 16 mm anodisch) ein Aktivitätsmaximum. Ein weiteres Aktivitätsmaximum beobachtet man bei einer Wanderungsstrecke von 80 mm (anodisch), welches "freies" Eisen (eventuell Chelate zwischen ^{59}Fe und Glycin des Elektrophoresepuffers (55)) repräsentiert.

Nach Gewinnung der Gewebeüberstände (s. Schema II) und anschließender Disk-Gelelektrophorese (7,5 %iges Polyacrylamid-trenngel in Tris/Glycin Puffer pH = 8,1) ergab sich folgendes Bild (Abb. 22): nach einer Wanderungsstrecke von 16 mm ^{59}Fe -Ferritin (Gelscheibe Nr. 3) und nach einer Wanderungsstrecke von 80 mm (Gelscheibe Nr. 20) "freies" ^{59}Fe , das an niedermolekulare Liganden gebunden ist.

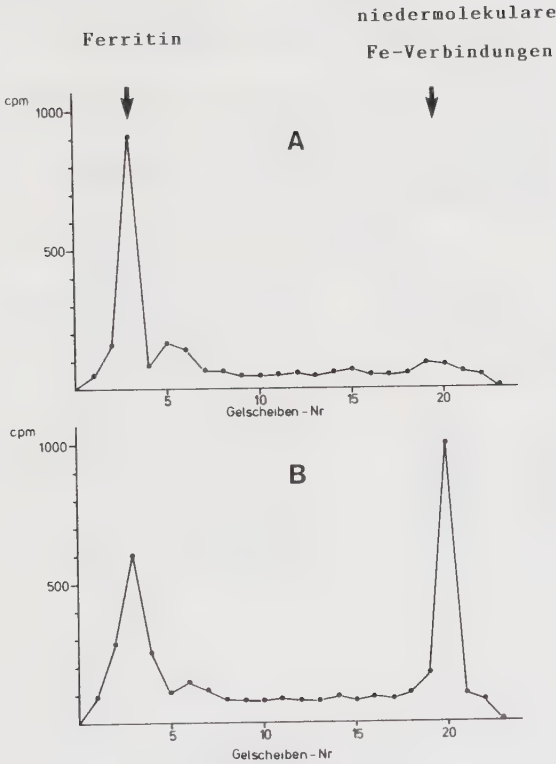


Abb. 22

Disk-Gelelektrophorese der hitzedenaturierten Überstände

- A) Radioaktivitätsprofil eines Leberhomogenats
(von einem eisenarmen Tier, wenig "freies" ^{59}Fe
vorhanden, auch aus Abb. 17, 18 zu sehen)
- B) Radioaktivitätsprofil eines Mukosahomogenats
(von einem Kontrolltier, "freies" ^{59}Fe bei Gel-
scheibe Nr. 20, vorhanden, auch aus Abb. 15, 16
zu sehen).

Um sicher zu sein, daß der ^{59}Fe -Radioaktivitätsgipfel (Wanderungsweite 16 - 20 mm) auch ^{59}Fe -Ferritin darstellt, wurde einem hitzedenaturierten Überstand (z.B. Mukosahomogenat $c = 920 \text{ ng Ferritin}/200 \mu\text{l}$) ein Überschuß an Anti-Ferritin (240 $\mu\text{g IgG}$) zugegeben. Nach 16 h bei 4°C wurde abzentrifugiert und der Überstand einer Disk-Gelelektrophorese (analog D. 1.4.a) unterzogen.

Abb. 23 zeigt, daß der Gipfel bei Gelscheiben Nr. 4 - 5 verschwindet.

Mißt man die Radioaktivität des Immunpräzipitats, so findet man 85% der Aktivität des Gipfels wieder.

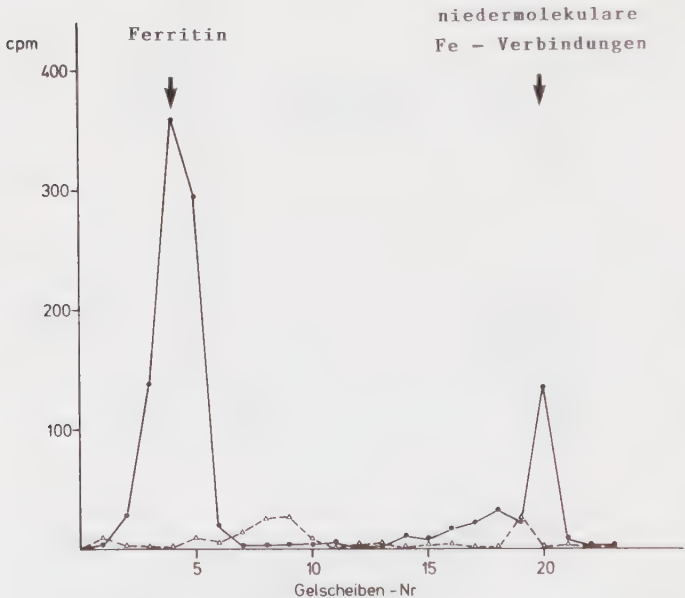


Abb. 23

Disk-Gelelektrophorese von einem hitzedenaturierten Mukosahomogenatüberstand einer normalen Ratte ($c = 920 \text{ ng Ferritin}/200 \mu\text{l}$)

A) — ohne Zugabe von Anti-Ferritin IgG

B) --- nach Zugabe von einem Überschuß an Anti-Ferritin IgG

D. 9. ⁵⁹Fe-Eiseneinbau in Hämoglobin

Die Bestimmung der ⁵⁹Fe-Inkorporation ins Hämoglobin geht im wesentlichen auf die grundlegende Arbeit von Teale (40) zurück. Auf dieser Basis wurde unter Berücksichtigung der Arbeit von Ward et al (41) folgende Modifikation entwickelt. Die Spaltung des Häms vom Globin erfolgte mit Phosphorsäure, statt mit Salzsäure, die Trennung des Häms vom Globin mit Cyclohexanon statt mit Methyl ethylketon (s. Ergebnisteil Abschnitt C. 3.).

Dabei wurden 0,5 ml gewaschene Blutzellen mit 2 ml Digitoninlösung ($c = 1,63 \text{ mg/ml}$) 1 h bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde mit 2 ml 9 M H_3PO_4 versetzt und wiederum 20 Minuten bei 37°C reagieren gelassen. Als nächstes wurden 0,5 ml H_2O und 1 ml gesättigte KH_2PO_4 - Lösung zugegeben und der Reaktionsansatz kräftig geschüttelt.

Schließlich wurden 6 ml Cyclohexanon (Art. Nr. 2888 Fa. Merck) zupipettiert, geschüttelt und 15 Minuten bei 6000 U/min abzentrifugiert (Heraeus Zentrifuge, Minifuge 2). Die Radioaktivität von 2 ml dieser Flüssigkeit wurde im Gammaspektrometer (Modell Prias, Fa. Beckmann, U.S.A.) bestimmt.

D. 10 Tierexperimente

D. 10.1. Antikörpergewinnung

Für die Antikörperproduktion wurden als Versuchstiere Kaninchen (Körpergewicht 4 - 5 kg) unspezifischer Rasse benutzt. Als Antigen wurde Rattenleberferritin verwendet, das wie in Kapitel D. 1. beschrieben, aufgearbeitet wurde. Pro Injektion wurden 50 - 100 µg Ferritin eingesetzt. Das Antigen wurde in Form einer Emulsion mit Freund's Adjuvans injiziert. Proteinlösung und Adjuvans wurden zu gleichen Teilen eingesetzt, pro Kaninchen wurden ca. 1 ml Emulsion verabreicht (s. auch Herbert (42)).

Erstinjektion:

Verwendung von kompletten Freund's Adjuvans (Kat. Nr. F-4258, Fa. Sigma, München). Die Injektion erfolgte intradermal rechts lateral an der unteren Flankenseite (nach Abrasieren der Fellhaare).

Zweitinjektion:

Sie wurde intradermal und zusätzlich intramuskulär in demselben Bereich bei Verwendung von inkompletten Freund's Adjuvans (Kat. Nr.- F-5506, Sigma, München) durchgeführt.

Zwischen Erst- und Zweitinjektion lagen zwei Wochen, nach weiteren zehn Tagen wurde ca. 1 ml Blut aus der Mittelarterie des Ohres entnommen. Das Blut wurde 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, der sich bildende Blutkuchen wurde von der Glaswand gelöst. Die Reagenzgläser mit dem geronnenen Blut blieben 16 h bei 4°C stehen. Nach Zentrifugation bei 4000 U/min (10 min) wurde das Serum als Überstand gewonnen (43) und die Immunreaktion per Immunblot (s. Ka. D. 4.1.) untersucht.

Einen guten Antikörpertiter erhielt man nach ca. 4 - 5maliger Zweitinjektion der Tiere in jeweils 10tägigen Abständen, wobei man bei der Abnahme bis zu 20 ml Blut entnehmen konnte. Die Prüfung auf Spezifität und Titer erfolgte nach den beschriebenen Verfahren (21, 31).

D. 10.2 Tiere für Eisenresorptionsexperimente

In allen Versuchen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten benützt (Herkunft: Süddeutsche Versuchstieranstalt Tuttlingen). Das Anfangsgewicht der Tiere lag zwischen 120 und 140 g, zum Zeitpunkt der oralen Eisengabe wogen die eisenarmen Tiere 270 - 310 g, die normalen 320 - 350 g. Die Kontrolltiere erhielten normales Futter (R + M - H 1003 der Fa. Alma Kempten) und Leitungswasser.

D. 10.3. Erzeugung von Eisenmangel bei Ratten

Versuchstiere, die eine Eisenmangelanämie entwickeln sollten, wurden gemäß den Angaben von Forth und Andres (44) mit einer eisenarmen Diät (3,4 mg Fe/kg) sowie mit destilliertem Wasser versorgt. Die zur Fütterung benutzte Diät setzte sich aus Vollmilchpulver (60%), Maisstärke (30%), Milcheiweißhydrolysat und Füllstoffen (je 5%), sowie Salzen, Spurenelementen und Vitaminen zusammen. Die genauen Angaben können der Originalarbeit (44) entnommen werden. Des weiteren wurde den Tieren zweimal wöchentlich ein bis zwei ml Blut durch Herzpunktion entzogen.

D. 10.4. Messung der ^{59}Fe -Retention nach oraler Verabreichung der Eisenpräparate

Um eine genaue Retentionsbestimmung durchführen zu können, sollte die einzusetzende ^{59}Fe -Aktivitätsmenge eine möglichst hohe spezifische Aktivität haben. Dies gilt vor allem für die Radioaktivitätsmessung der Organe und der Ferritinfraktion, da bei frühen Zeitpunkten (0,5 h) der Experimente mit einem geringen ^{59}Fe -Einbau zu rechnen war.

Jedoch war der Eisenpolymaltosekomplex durch die Präparation in seiner spezifischen Aktivität limitiert (0,6 mCi/mg Fe). Außerdem mußten von jedem der drei Präparate ungefähr 2 - 3 mCi gelagert werden, um die Durchführung der Experimente von anfangs unbestimmten Lieferungen unabhängig zu machen. All diese Punkte bedingten die Einschränkung der Gesamtmenge an Radioaktivität. Vorversuche mit 10 - 30 μCi ^{59}Fe pro Tier zeigten, daß ca. 30 μCi eine ausreichende Dosis für die nachfolgenden Bestimmungen war. Die in unseren Versuchen eingesetzte Aktivität pro Tier, bedingt vor allem durch die spezifische Aktivität des ^{59}Fe -Eisenpolymaltoseprodukts, war ein akzeptabler Kompromiß für all diese Voraussetzungen.

Zur oralen Applikation von Eisen wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

- 1) FeCl_3 (1 mg/ml) in 0,1 N HCl pH = 2,0
- 2) FeSO_4 (1 mg/ml) in 0,1 N H_2SO_4 pH = 2,0

Das ^{59}Fe -Eisenpolymaltoseprodukt wurde für die Applikation nur noch auf 1 ml Flüssigkeit mit physiologischer Kochsalzlösung pH = 5,5 (mit HCl eingestellt) aufgefüllt.

Den beiden kommerziell erhaltenen ^{59}Fe -Salzen,

- a) $^{59}\text{Fe}-\text{FeCl}_3$ (NEN, Dreieich, Kat. Nr. NEZ 037) spezif. Aktivität 29,7 mCi/mg Fe
- b) $^{59}\text{Fe}-\text{FeSO}_4$ (NEN, Dreieich, Kat. Nr. NEZ 049) spezif. Aktivität 29,7 mCi/mg Fe

mußte noch zusätzlich unmarkiertes Fe zugegeben werden. Diese Menge richtete sich nach dem Körpergewicht der Tiere. Da die Dosis 0,2 mg Fe/kg Körpergewicht betragen sollte, mußte Fe aus Stammlösung 1) und 2) zugegeben werden.

Unmittelbar nach Verabfolgung der gesamten ^{59}Fe -markierten Eisendosis (in 1 ml physiol. NaCl-Lsg.) wurden die Ratten in eine Meßanlage für Kleintiere (Modell Armac, Fa. Packard) gebracht, wobei diese Radionuklidbestimmung als 100%-Wert der Dosis zugrunde gelegt wurde. Während der Meßzeit von 1 Minute befanden sich die Tiere in Käfigen, die so bemessen sind, daß sie sich nicht bewegen können. Bei dem Meßvorgang war Sorge zu tragen, daß die Käfige mit den Tieren stets in gleicher Weise plaziert wurden. Die Einhaltung konstanter Meßgeometrie ist in diesem Gammaskpektrometer Bedingung für reproduzierbare Messungen. Drei Stunden nach der letzten Eisengabe erhielten die Tiere das eisenarme Futter, um für den Zeitraum bis 28 h eine Beeinflussung durch nachfolgendes Futtereisen zu vermeiden. In der Zeit des Futterentzuges wurde den Tieren das Trinkwasser belassen. Am Versuchsende, nach 0,5; 2,5; 6 und 28 Stunden wurde den mit Ether narkotisierten Tieren Blut per Herzpunktion (max. 5 ml) entnommen und der

Hb- und Hk-Wert bestimmt. Anschließend wurde das Abdomen entlang der linea alba geöffnet, die Leber mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung von der vena portae hepatica aus perfundiert, die posterior vena cava durchschnitten und das Organ herausgenommen. 10 cm des proximalen Dünndarms, ausgehend vom Pylorus (in der Arbeit im folgenden als Duodenum bezeichnet) wurden ebenfalls entnommen und mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung durchspült, um die nicht von der Mukosa aufgenommene Radioaktivität zu entfernen. Restkörper, Duodenum, Restdarm, Magen, Leber und Blut wurden ebenfalls im Kleintierzähler gezählt. Das Volumen des entnommenen Blutes wurde notiert und danach 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (Haeraeus Christ Minifuge 2).

Die Blutzellen wurden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, das Plasma wie auch alle anderen Organe, wurde im Ganztierzähler gezählt.

Der ^{59}Fe -Retentionswert der einzelnen Eisenderivate errechnet sich demnach nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} & ^{59}\text{Fe-Retention (cpm)} \\ & = \text{}^{59}\text{Fe-Isotop im "blutleeren" Restkörper (cpm)} \\ & + \text{}^{59}\text{Fe-Isotop in der Gesamtleber (cpm)} \\ & + \text{}^{59}\text{Fe-Isotop im Gesamtblut (cpm)} \end{aligned}$$

Der ^{59}Fe -Gehalt im Gesamtblut errechnet sich aus 6% des Körpergewichts (45, 46).

E. DISKUSSION

E. 1. Plasma- und Gewebeferritingehalte

Zur Beurteilung der Ferritinaufarbeitungen und der immunologischen Gewebeferritinbestimmungen gibt es zwei Punkte, die in Betracht gezogen werden mußten.

1. Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß es kein einheitliches Ferritin gibt, sondern eine Reihe von Isoferritinen. Je nach Gewebe variiert der isoelektrische Punkt (Ip) von 4,8 - 5,7. Dies hängt von der quantitativen Zusammensetzung der schweren und leichten Untereinheiten ab (81, 83).
2. Die Isoferritine unterscheiden sich nicht in ihrem Eisengehalt, sondern in der Zusammensetzung ihrer Proteinuntereinheiten. Herzisoferritine sind hauptsächlich aus schweren H-Untereinheiten (H = heavy subunit, MG: 21 000 D) aufgebaut und haben einen niedrigen isoelektrischen Punkt (Ip = 4,8), Isoferritine von Leber und Milz hingegen bestehen hauptsächlich aus leichten L-Untereinheiten (L = light subunit, MG: 18 000 D) mit einem höheren isoelektrischen Punkt (Ip = 5,7) (2, 84).

Plasmaferritin, das aus Isoferritinen zusammengesetzt ist, entstammt größtenteils dem retikuloendothelialen System von Leber- und Milzzellen (127). Aufgrund dessen schlug das "International Committee for Standardization in Haematology" Expertpanel on Iron (85), Leberferritin, bzw. Antikörper gegen Leberferritin als Standard bei immunologischen Ferritinbestimmungen im Plasma von Menschen vor.

Wir konnten eine komplette Identität zwischen unserem Antikörper (Anti-Rattenleberferritin) und Mukosaferritin im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest (Abb. 6b) nachweisen.

Vergleichen wir unsere Leberferritinwerte von normalen Ratten mit den Werten anderer Untersuchungen, so finden wir eine gute Übereinstimmung.

Sowohl die mit Hilfe der Radialimmunodiffusion nach Mancini bestimmten Werte von Bjorklid (52) mit 250 μg Ferritin/g Gewebefeuchtgewicht, als auch die per Immunotitration (d.h. Ausfällung von Ferritin mit Antikörper und anschließender Proteinbestimmung des Niederschlages) ermittelten Leberferritinwerte von Cumming et al (102) mit 213 μg Ferritin/g Gewebefeuchtgewicht stimmen mit unseren Werten von durchschnittlich 207 μg Ferritin/g Gewebefeuchtgewicht sehr gut überein. Die Immunotitrationsmethode hingegen stellt ein unpräzises Verfahren dar, da mit einer Kopräzipitation anderer Gewebeproteine im Antigen-Antikörperpräzipitat zu rechnen ist. Die Leberferritinwerte von Carmal und Konjin (25) mit 505 μg Ferritin/g Protein (= 230 μg Ferritin/g Gewebefeuchtgewicht) normaler Ratten, liegen im Nachweisbereich des Laurell-Assays. Es gibt kaum Daten über den Ferritingehalt der Leber eisenarmer Ratten; dies liegt sicherlich an der geringen Empfindlichkeit des Laurell-, bzw. Mancini-Assays, deren Nachweisgrenzen bei 0,1 μg Ferritin/10 μl einzusetzender Probenlösung liegt. Die daraus resultierenden Grenzwerte liegen demnach bei 50 - 100 μg Ferritin/g Gewebefeuchtgewicht. Unsere durchschnittlichen Leberferritinwerte eisenarmer Ratten hingegen, gemessen mit dem Radioimmunoassay, lagen bei 4 μg Ferritin/g Gewebefeuchtgewicht und somit um das 12,5 - 25fache unterhalb der Nachweisgrenze des Laurell- und Mancini-Assays (s. Tab. 7).

Tab. 7

Gegenüberstellung der verschiedenen Gehaltsbestimmungen von Rattenferritin und deren Empfindlichkeit in $\mu\text{g/g w.w.}$ (w.w. = Gewebefeuchtgewicht)

(n) normale Ratten, (a) eisenarme Ratten, (25, 52, 102)* Literaturstellen siehe H. Tabelleranhang

Der besonders niedrige Gehalt in der Leber eisenarmer Tiere, der Duodenalmukosa, sowie im Plasma beider Versuchsgruppen, verdeutlicht die Notwendigkeit der Ferritinbestimmung per Radioimmunoassay.

Testmethode	Leberferritingehalt ($\mu\text{g/g w.w.}$) (n)	(a)	Mukosaferritingehalt ($\mu\text{g/g w.w.}$) (n)	(a)	Plasmaferritingehalt ($\mu\text{g/ml}$) (n)	(a)	Nachweisgrenze der Methode
Immunotitrations- methode							
a) (102)*	213	-	-	-	-	-	100 $\mu\text{g/g w.w.}$
b) (25)*	230	-	-	-	-	-	
Mancini-Assay							
c) (52)*	250	-	-	-	-	-	50 - 100 $\mu\text{g/g w.w.}$
Laurell-Assay							
d) (25)*	210	-	-	-	-	-	50 - 100 $\mu\text{g/g w.w.}$
Radioimmuno- assay	207	4	11	2,6	0,9	0,6	bis zu 0,5 $\mu\text{g/g w.w.}$ bzw. bis zu 0,01 $\mu\text{g/ml}$

Cumming et al (102) erhielten 0,222 mg Leberferritin pro Tier für eisenarme Ratten (Hb: $7,8 \pm 1,2$) mit der Immunotitrationsmethode. Ihr Verfahren, die Ratten eisenarm zu machen, bestand darin, daß sie den Tieren 0,5 - 1 ml Blut täglich über einen Zeitraum von vierzehn Tagen entzogen. Legt man 5 g Leberfeuchtgewicht für eine 150 g Ratte, wie sie von Cumming et al verwendet wurden, zugrunde, so kommt man auf einen Wert von 44 µg Ferritin/ g Gewebefeuchtgewicht. Auf die Mukosaferritinwerte von Cumming et al (102), die mit 0,139 mg Mukosaferritin pro Tier sowohl für normale als auch für eisenarme Ratten angegeben werden, kann wiederum nur indirekt eingegangen werden, da weder Daten vom Darmabschnitt noch vom Mukosagewicht vorliegen. Bei der Annahme von 1 Meter Gesamtdarmlänge von 200 g schweren Ratten und einem daraus zu berechnenden Mukosafeuchtgewicht von 3,7 g kommt Cumming auf 38 µg Ferritin/g Gewebefeuchtgewicht. Diese Werte liegen um den Faktor 380 höher als die Mukosaferritinwerte von Savin und Cook (51), die mit einem immunoradiometrischen Assay bestimmt wurden. Deren Werte von 98 ng/mg Protein für normale Tiere und 20 ng/mg Protein für eisenarme Tiere stimmen gut mit unseren Mukosaferritinwerten von 100 ng Ferritin/mg Protein normaler Ratten und 16 ng Ferritin/mg Protein eisenarmer Ratten überein.

Ähnliche Werte erhielten auch Johnson et al (117), mit Hilfe ihres Radioimmunoassays, von 220 ng Ferritin/mg Protein in normalen Ratten und 31 ng Ferritin/mg Protein für eisenarme Ratten.

Die gute Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen, kann neben dem vergleichbaren Eisenstatus der Tiere (Hb-Wert eisenarmer Tiere 6 g/dl) auch auf die Verwendung desselben Rattenstammes (männliche Sprague-Dawley Ratten) und auf das annähernd übereinstimmende Gewicht der Tiere, 250 - 350 g, zurückgeführt werden.

Neben diesen aufgezählten Punkten war auch das Verfahren, einen Eisenmangel zu erzeugen, vergleichbar, nämlich Verfütterung einer eisenarmen Diät (Savin und Cook (51): 8 µg Fe/g Futter) bei gleichzeitiger Blutentnahme von 3 - 5 ml wöchentlich.

Die Arbeitsgruppen (41, 53, 87) die bisher Ferritin im Plasma von Ratten bestimmt haben, kamen zu verschiedenen Ergebnissen. Mack et al (53) fanden Plasmaferritinwerte in einem Bereich von 15 - 118 ng/ml bei eisenarmen und von 170 - 620 ng/ml bei normalen Ratten.

Christopher et al (87) bestimmten Plasmaferritinwerte, die noch höher lagen: 800 ng/ml bei eisenarmen Ratten und 1400 - 2600 ng/ml bei normalen Ratten. Auch unsere eigenen Plasmaferritinwerte schwankten sehr, 17 - 205 ng/ml für normale Tiere und 12 - 173 ng/ml für eisenarme Tiere, somit ließ sich kein deutlicher Unterschied zwischen normalen und eisenarmen Tieren zeigen. Eine Kontrolle der Ferritinwerte im Plasma über die Bestimmung der Wiederfindungsraten der verschiedenen Verdünnungen und der verschiedenen exogenen Ferritinzusätze bestätigte jedoch die Gültigkeit unserer Messungen (s. C. 4.2. Tab. 6). Die Ursachen für die unterschiedlichen Plasmaferritinwerte sind unbekannt. Ward et al (41) konnten einen signifikanten, jedoch keinen absoluten Zusammenhang zwischen Serumferritinkonzentrationen und Eisenspeicher der Leber feststellen. In ihren Versuchen erhielten Ratten eine Diät mit unterschiedlichem Eisengehalt. Eine Differenz des Eisenangebotes konnte zuverlässig durch Bestimmung des Non-Hämeisengehaltes der Leber unterschieden werden, die Serumferritinwerte waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Serumferritin könnte das Produkt von Leber-, Milz- und Knochenmarkzellen sein, die nach Absterben ihren Zellinhalt und damit auch Ferritin an das Plasma abgeben (41). Eine mögliche Erklärung für sehr hohe Serumferritinwerte wäre ein erhöhtes Absterben von normalen Leberzellen oder das Absterben von Zellen mit hohem Eisengehalt. Einen Hinweis darauf fanden Prieto et al (88), in dem sie Lebereisenwerte mit einem Quotienten aus Serumferritin und Serumtransaminase bei Patienten mit chronischen Leberschäden korrelierten. Des weiteren können unterschiedliche Serumferritinwerte an der häufig zu niedrigen Bioverfügbarkeit von Kupfer in den Rattendiäten liegen (89).

Unzureichende Kupferzufuhr kann die normale Erythropoese verhindern, auch wenn genügend Speichereisen vorhanden ist (90).

Es bleibt hier also eine gewisse Unsicherheit bei der Beurteilung von Plasmaferritinwerten in Ratten. Die Korrelation zwischen Eisenspeicher (Leberferritin) und Plasmaferritin mag hier grundsätzlich nicht so ausgeprägt sein und ist sicherlich abhängig von den Tieren, deren Alter und Fütterung.

E. 2. Kinetik der ^{59}Fe -Aufnahme und Bioverfügbarkeit von zwei- und dreiwertigen ^{59}Fe -Derivaten

Es gibt eine Reihe von Methoden, mit welchen die Bioverfügbarkeit von Eisen bestimmt werden kann. Von chemischen Differenzmessungen zwischen aufgenommenem und ausgeschiedenem Eisen ist man wegen der Aufwendigkeit der Methodik und der zu großen Ungenauigkeit abgekommen.

Die Bestimmungsart, die den physiologischen Bedingungen der Eisenresorption am nächsten kommt, ist die Bestimmung der ^{59}Fe -Utilisation roter Blutzellen und die Ganzkörperradioaktivitätsmessung (Retention) von oral verabreichten ^{59}Fe -Eisenderivaten (113).

Die Grundlage für die ^{59}Fe -Utilisationsbestimmung roter Blutzellen ist die Beobachtung, daß über 80% des resorbierten Eisens nach 7 - 10 Tagen in den roten Blutzellen zu finden ist. Dies gilt sowohl für gesunde als auch für eisenarme Patienten (91). Eine hohe Korrelation ($r = 0,96$) zwischen Ganzkörperzählung und ^{59}Fe -Utilisation roter Blutzellen fanden auch Larsen und Milman (92).

Neben diesen Bestimmungen der Bioverfügbarkeit wurde der ^{59}Fe -Einbau in Hämoglobin oder roter Blutzellen und die von Ekenved (54) beschriebene Methode des maximalen Anstieges der ^{59}Fe -Plasmaeisenkonzentration (s. Ergebnisteil C. 4.4.) als Index für die Eisenresorption ermittelt.

Als Basis der Ganzkörperzählung wurde die retinierte Menge des ^{59}Fe im Körper zugrunde gelegt, da die Verluste von Eisen z.B. über den Urin vernachlässigbar klein sind (93).

Im Vergleich zu einer gebräuchlichen Eisendosis für einen erwachsenen Menschen (1,5 mg Fe/kg) lag unsere bei 0,2 mg Fe/kg im suboptimalen Bereich der gewöhnlichen therapeutischen Dosis. Höhere Dosen von 0,5 - 5 mg Fe/kg Ratte, wie sie in früheren Experimenten angewendet wurden (82, 105), stimulierten die De-novo-Synthese von Apoferritin in beträchtlichem Maße (82, 124). Um die ^{59}Fe -Aufnahme in schon vorhandene Ferritinmoleküle zu messen, ohne den komplizierten Effekt der De-novo-Synthese berücksichtigen zu müssen, erschien diese niedrige Dosis als angebracht. Außerdem mußte mit einkalkuliert werden, daß die Kapazität Eisen zu resorbieren, sowohl für normale als auch für eisenarme Ratten begrenzt ist. Bei peroral behandelten Ratten lag das Maximum bei ca. 3 mg Fe/kg Körpergewicht (80). Demnach war auf keinen Fall zu befürchten, daß die von uns angewendete Dosis oberhalb der Resorptionskapazität des intestinalen Transportsystems für Eisen liegen könnte.

Unter diesen Umständen kann also die Resorption von Eisen aus verschiedenen Eisenverbindungen ein Maß für die Bioverfügbarkeit verschiedener Präparate sein.

Unsere Ergebnisse zeigen keinen Unterschied in der Resorption und Utilisation zwischen FeCl_3 und FeSO_4 und stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Schäfer und Forth (94).

Der Eisenpolymaltosekomplex dagegen zeigt ein signifikant unterschiedliches pharmakokinetisches Verhalten gegenüber den Eisensalzen und erreicht nach einer Versuchsdauer von 28 Stunden ca. 70% von deren Retentionswert.

Die grundsätzliche Streitfrage in der Bioverfügbarkeit zwischen zwei- und dreiwertigen Eisenionen kann mit der unterschiedlichen Löslichkeit von Eisenionen verschiedener Wertigkeit im neutralen pH-Bereich (pH = 6,5 - 6,9) des Duodenums erklärt werden (125).

Das zweiwertige Eisenhydroxid ist im Gegensatz zum dreiwertigen Eisenhydroxid bei $\text{pH} = 6 - 7$ löslich. Im biologischen Milieu wird zweiwertiges Eisen rasch zum dreiwertigen oxydiert, wenn nicht ein Oxydationsschutz zugegeben wird, wie z.B. Ascorbinsäure, Glutathion oder Cystein. In tierexperimentellen Studien an Ratten wurde wiederholt nachgewiesen, daß die Resorbierbarkeit von zwei- und dreiwertigem Eisen sich dann nicht unterscheidet, wenn das Eisen der Mukosa des Darms direkt ionisiert angeboten wird (62).

In unserer Studie wurde den Ratten FeCl_3 und FeSO_4 bei $\text{pH} = 2,0$ per os verabreicht, wobei kein signifikanter Unterschied in der Retention und Utilisation zu erkennen war. Eine Erklärung hierfür kann eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Fe(II) und Fe(III) bei per os Resorptionsversuchen sein.

Erni et al (128) diskutierten sogar die Bildung von schlecht definierten Eisen (III)-Spezies aus Eisen (II)-Salzen im Magen-Darmtrakt.

Der Eisenpolymaltosekomplex wurde bei $\text{pH} = 5,5$ angeboten (lt. Firmenangabe ist der Eisenpolymaltosekomplex bei $\text{pH} = 5,5$ am stabilsten) und zeigte die geringste Retention bei normalen Ratten. Bei den eisenarmen Ratten ist jedoch eine bedeutend höhere Retention zu finden, die linear ansteigt und nach 28 Stunden noch nicht beendet zu sein scheint.

Zur Interpretation der unterschiedlichen Bioverfügbarkeit verschiedener Eisenderivate muß man neben den chemischen Eigenschaften des zwei- und dreiwertigen Eisens vor allem die vorhandenen Liganden für Eisen betrachten, die sich in drei große Gruppen unterteilen (96).

1. Liganden, die Eisen in schwer lösliche und für die Resorption kaum verfügbare Komplexe überführen. Dazu zählen vor allem die in pflanzlicher Nahrung reichlich vorhandenen Phosphate, Tannine und Phytate (114, 115).

2. Eine zweite Gruppe von Liganden bildet mit Eisen Komplexe einer mittleren Stabilität, die ihr Eisen mit den Liganden des eisenbindenden Systems der Mukosa austauschen können. Dies trifft für die meisten therapeutisch verwendeten Eisenverbindungen zu, deren thermodynamische Gleichgewichtskonstante zwischen $K = 10^{-12} - 10^{-14}$ liegt.
3. Eisenkomplexe höherer Stabilität neigen nicht oder in geringem Maße zum Austausch des Eisens mit den Liganden des eisenbindenden Systems in der Mukosa. Zu den austauschfähigen Komplexen gehören Fe Oxypolycarbonsäuren und vor allem Aminosäuren.

Zu der dritten Gruppe von Komplexen zählen lipophile Eisenverbindungen, die das Mukosaepithel vorbei am Eisentransportsystem intakt aufnimmt. Hierzu zählen der 8-Hydroxychinolin-Fe (III)-Komplex $K = 10^{-37}$ (86) und zum Teil das Hämoglobineisen, das teilweise schon in der Mukosazelle durch die Hämoxigenase gespalten wird (97, 116) und so für das Transportsystem zur Verfügung steht, ein anderer Teil aber gelangt unverändert ins Blut.

Das in der Leber freigesetzte Eisen aus dem Blut kann dann für die Neubildung von Hämoglobin an den Stellen der Blutbildung nutzbar gemacht werden.

Der von uns verwendete Eisenpolymaltosekomplex zählt zur zweiten Gruppe von Eisenkomplexen, wie Geisser und Moller (95) zeigten, dissoziiert er langsam im künstlichen Magensaft ($\text{pH} \approx 1,2$; 37°C) und hat eine Halbwertszeit von 5 - 8 Stunden unter diesen Bedingungen.

Unsere Studie ergab, daß das dreiwertige Eisen aus dem Polymaltosekomplex von normalen Ratten nach 28 Stunden ähnliche Retentionswerte erzielte wie die entsprechenden Gruppen der mit FeCl_3 und FeSO_4 behandelten Tiere.

Nach 28 Stunden Versuchsdauer betrugen die Retentionswerte eisenarmer Tiere 83% der FeCl_3 , 80% der FeSO_4 und 50% der Fe-PM Gruppe. Ein vergleichbares Ergebnis fanden jedoch mit einer Retentionsmessung nach 23 Tagen auch Schäfer und Forth (94), 68% für FeSO_4 , 77,5% für FeCl_3 und 53% für Fe-PM.

E. 3. ^{59}Fe -Utilisation in roten Blutzellen und ^{59}Fe -Hämsynthese

Die ^{59}Fe -Aufnahme in rote Blutkörperchen stellt neben der ^{59}Fe -Messung der Leber die beste Grundlage zur Utilisationsbewertung von ^{59}Fe -Derivaten dar.

Der pharmakokinetische Unterschied zwischen den Eisensalzen und dem Fe(III) -Polymaltosekomplex ist neben dem ^{59}Fe -Verlauf im Gesamtblut, dem ^{59}Fe -Blutzelleisen auch in der ^{59}Fe -Hämeisensynthese zu verfolgen (Abb. 19).

Die Aufnahme von ^{59}Fe in zeitlicher Abhängigkeit von $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ im Blut ist fast identisch über den Zeitraum von 28 Stunden, das des ^{59}Fe -Polymaltosekomplexes beträgt etwa 30% dieser Werte bei eisenarmen Tieren, wobei der Unterschied bei den normalen Tieren nur ca. die Hälfte einnimmt. Beim Vergleich des ^{59}Fe in den Blutzellen und im Hämoglobin ist ein deutlich höherer Anteil der ^{59}Fe -Radioaktivität bei eisenarmen Tieren zu finden (Abb. 19), ansonsten sind die Verläufe ziemlich ähnlich, jedoch mit einem Unterschied, daß die ^{59}Fe -Blutzelleisenwerte höher sind als die ^{59}Fe -Hämeisenwerte. Dies könnte neben der Tatsache, daß vermehrt ^{59}Fe an der Retikulozytenmembran haftet, auch daran liegen, daß das ^{59}Fe -Ferritin im Cytosol von Retikulozyten einen intermediären Eisenpool einnimmt (112).

E. 4. ^{59}Fe -Einbau in Leberferritin als Parameter für die Bioverfügbarkeit von Eisenderivaten

Grundsätzlich ist eine höhere ^{59}Fe -Retention in Lebern eisenarmer Tiere bei allen drei Eisenderivaten zu beobachten (Abb. 17),

wobei der ins Ferritin eingebaute Anteil des Leberradiocisens normaler Tiere durchschnittlich fünfmal höher liegt als der eisenarmer Tiere. Der große Unterschied im Leberferritingehalt normaler zu eisenarmer Ratten (Faktor 50 niedriger bei eisenarmen Tieren) erklärt den niedrigen ^{59}Fe -Anteil der sich im Leberferritin eisenarmer Tiere findet.

Der höhere ^{59}Fe -Non-Ferritineisenanteil in Lebern eisenarmer Ratten kann an Liganden wie Aminosäuren oder an Transferrin gebunden sein, welches im Eisenmangelzustand in erhöhtem Maße im Lebergewebe synthetisiert wird (98, 99). Ein völlig anderes Bild über die ^{59}Fe -Verwertung in der Leber erhält man bei Betrachtung der spezifischen Einbaurate von ^{59}Fe in Leberferritin (Abb. 18). Hier wird deutlich, daß der ^{59}Fe -Gehalt im Ferritin der eisenarmen Tiere sehr viel höher liegt als bei den Kontrolltieren. Ein Unterschied im spezifischen Einbau zwischen den Eisensalzen (FeCl_3 und FeSO_4) und dem Eisenpolymaltosekomplex ist deutlich zu sehen. Da das Maximum des spezifischen Einbaus bei allen drei Präparaten zwischen 2,5 und 6 Stunden liegt und danach kontinuierlich absinkt, ist eine eindeutige Beurteilung der Bioverfügbarkeit anhand dieser Daten zu späteren Zeitpunkten schlecht möglich. Der "turnover" von ^{59}Fe in Leberferritin eisenarmer Ratten ist bei allen drei Derivaten über den Versuchszeitraum von 0,5 - 28 Stunden (s. Abb. 18) im Durchschnitt um den Faktor 5 höher als bei den Kontrolltieren. Vergleicht man also den Einbau von ^{59}Fe aus den verschiedenen Derivaten in das Leberferritin nach 2,5 Stunden Versuchsdauer miteinander und setzt man den ^{59}Fe -Gehalt nach Gabe von $^{59}\text{Fe}-(\text{FeCl}_3)$ gleich 100%, so erhält man für FeSO_4 242% bei den Kontrollen, 1484% bei eisenarmen Tieren - FePM 34% bei den Kontrollen und 223% bei den eisenarmen Tieren.

Das ins Leberferritin zwischenzeitlich eingebaute ^{59}Fe wird aus dem Protein mobilisiert und im Eisenmangelzustand zum funktionell wichtigeren Ort des Organismus, dem blutbildenden System transportiert.

Anzeichen für diesen Verlauf geben auch die ^{59}Fe -Radioaktivitätsmessungen von Lebern und Gesamtblut der drei untersuchten Derivate von Schäfer und Forth (94).

E. 5. Zusammenhang zwischen Eisenresorption und duodenalem Mukosaferritin

Dem Ferritin der Dünndarmmukosa wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine bedeutende Rolle als Regulator der Eisenresorption zugesprochen (100, 101).

Brittin und Raval (77) fanden, daß eisenarme Ratten nach oraler Eisengabe ihre Fähigkeit zur Synthese von mukosalem Ferritin unverändert beibehielten. Worwood und Jacobs (103) berichteten, daß der Einbau von oral verabreichtem Eisen in mukosales Ferritin eisenüberladener Tiere größer war, als der in das Ferritin normaler Tiere.

Es sollte erwähnt werden, daß die meisten Arbeiten über das mukosale Ferritin zwar die ^{59}Fe -Aufnahme in den Ferritinpool zum Gegenstand hatten, oder auf die Induktion der Ferritinsynthese eingingen, jedoch die spezifische Beladung des Ferritins nicht untersuchten.

Aus diesen Studien konnten keine Beziehungen zwischen der Eisenresorption und den Mukosaferritinwerten abgeleitet werden.

Andere Autoren benutzten immunologische Techniken oder Non-Hämeisenbestimmungen mit begrenzter Empfindlichkeit, bei denen große Darmsegmente für die Bestimmung eingesetzt wurden (104).

Der Radioimmunoassay kann diese technischen Schwierigkeiten überwinden, da er erlaubt, Ferritin auch in kleineren Darmabschnitten einzelner Tiere zu bestimmen.

Ferritin als Reservoir des Speichereisens innerhalb der Zelle (für die Leber gilt das als gesichert), steht in enger Beziehung mit dem Körpereisenstatus. Für Mukosaferritin war dies auch anzunehmen, da im Eisenmangelzustand wesentlich geringere Mukosaferritingehalte (ca. 5fach geringer) bei gleichzeitig

erhöhter ^{59}Fe -Resorption festzustellen war (51).

Der Zusammenhang verdeutlicht sich wenn man die Eisenresorptionswerte dem Mukosaferritingehalt gegenüberstellt. Die nach 0,5 Stunden höhere Resorption von ^{59}Fe bei eisenarmen Tieren gegenüber den normalen Tieren ist auch nach 28 Stunden zu erkennen.

Savin und Cook (51) fanden an abgebundenen Darmschlingen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Mukosaferritingehalt, gemessen im immunoradiometrischen Assay und der Eisenresorption. Betrachtet man die spezifische Beladung des Mukosaferritins (Abb. 16), so sieht man bei normalen Ratten eine sehr viel höhere spezifische Beladung als bei eisenarmen Ratten. Dieser zu frühen Zeitpunkten große Unterschied zwischen beiden Tiergruppen nimmt mit fortschreitender Versuchsdauer ab und ist nach 28 Stunden in etwa gleich groß (80). Im Gegensatz zu den in-vivo Versuchen (118, 119, 120) anderer Autoren ist in unseren Untersuchungen die ^{59}Fe -Aufnahme in die Mukosa eisenarmer Tiere bedeutend niedriger (Abb. 15).

Der höhere ^{59}Fe -Transfer aus Blut, verbunden mit einer niedrigeren spezifischen Einbaurate von ^{59}Fe ins mukosale Ferritin (bei einem 5fach niedrigeren Gewebeferritingehalt) könnte eine Erklärung für diese Beziehung sein.

Bei Gegenüberstellung der spezifischen ^{59}Fe -Beladung des Ferritins ($\text{ng } ^{59}\text{Fe}/\mu\text{g Ferritin}$) in der Mukosa mit der der Leber (Abb. 16, 18), sieht man daß die Mukosazellen im Eisenmangelzustand bedeutend weniger ^{59}Fe ins Ferritinmolekül einbauen als die Leberzellen.

Demnach könnte das Ferritin der Mukosazelle seine Speicherfunktion nicht in dem Maße ausüben, wie das der Leberzelle. Ob sich dadurch der erhöhte Transfer von ^{59}Fe durch den Darm eisenarmer Tiere ergibt, ist fraglich. Das Ferritin der Leberzelle jedoch behält seine Speicherfunktion für Eisen bei und gibt dieses im Bedarfsfall an das blutbildende System zur Hämoglobinsynthese ab.

E. 6. Bedeutung des Mukosaferritins und dessen Beladung für die intestinale Eisenresorption

Eine Reihe von Faktoren beeinflussen die mukosale Eisenaufnahme, die Marx et al (105) folgendermaßen bezeichneten:

- a) Der chemische Status des Eisenpräparates
(Fe (II); Fe (III); Häm- oder Non-Hämeisen)
und dessen Eigenschaft, ionisiertes Eisen
zur Verfügung zu stellen.
- b) Eisenmenge und die Zusammensetzung der Eisen-
derivate
- c) Magen- bzw. Darmsekretion
- d) Zustand der Bürstensaum- und Mukosazellen

Der mukosale Eisentransfer ist weniger von den intraluminalen Faktoren abhängig, sondern vom Körpereisenstatus. Wie Abb. 15 zeigt, ist mit einer hohen ^{59}Fe -Aufnahme in die Mukosa der Kontrolltiere nicht gleichzeitig eine hohe ^{59}Fe -Retention des Organismus verknüpft. Die Kontrolltiere aller drei Präparategruppen nahmen bedeutend mehr ^{59}Fe in die Duodenalmukosa auf; nach 28 Stunden war der Unterschied folgender:

Im Mittel hatten die Kontrolltiere aller drei Präparategruppen eine 3fach höhere ^{59}Fe -Aufnahme als die eisenarmen Tiere. Entsprechend war die ^{59}Fe -Beladung in Ferritin bei den Kontrolltieren höher. Im Gegensatz zu diesen Befunden standen die Ganzkörper-Retentionsmessungen eisenarmer Tiere nach 28 Stunden, die um den Faktor 1,4 - 1,7 höher lagen als die der Kontrollen. Die von Worwood et al (103) ausgefallten ^{59}Fe -ferritinhaltigen, hitzedenaturierten Homogenatsüberstände konnten einen geringeren ^{59}Fe - FeCl_3 -Einbau in Mukosaferritin eisenarmer Ratten feststellen.

Ihre Ergebnisse stehen mit unseren Befunden in Einklang. Dies läßt vermuten, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Eisenresorption nicht die mukosale Aufnahme, sondern der Transfer zum Plasma ist. Nathanson et al (121) konnten mit ihrem mathematischen 8-Kompartiment-Modell ähnliches feststellen, nämlich, daß die Aufnahme von ^{59}Fe in den mukosalen Speicherpool eisenarmer Beagle-Hunde herabgesetzt ist. Vergleicht man in normalen Ratten die spezifischen Einbauwerte von ^{59}Fe in das Ferritin der Mukosa und der Leber (Abb. 16, 18), so erkennt man im Mittel keinen Unterschied in der spezifischen Beladung beider Gewebe. Ganz anders ist dies bei eisenarmen Ratten. Beim Vergleich des spezifischen ^{59}Fe -Einbaus ins Mukosa- und Leberferritin fällt hierbei ein deutlicher Unterschied auf.

Dieser liegt darin, daß die spezifische Beladung des Mukosaferritins drastisch geringer ist, als die des Leberferritins und deutlich niedriger ist als in normalen Tieren. Dieser Befund untermauert die Hypothese, daß im Normalzustand überschüssiges Eisen in der Mukosa von Ferritin aufgenommen wird, da weniger resorbiert wird und daher mehr ^{59}Fe in der Zelle vorhanden ist.

Im Eisenmangelzustand als Modell erhöhten Eisenbedarfs, regelt das Mukosaferritin nicht den Eisentransport zum Blut, sondern die Eisenaufnahme in den Organismus geht am Mukosaferritin vorbei. Ein Ort für die direkte Regulation der Eisenaufnahme könnte die basolaterale Membran der Mukosazellen sein. So gesehen hätte das mukosale Ferritin eine indirekte regulative Funktion, indem es überschüssiges Eisen festhält und über die Abschilferung der Mukosazellen ausscheidet.

E. 7. Rechnerische Auswertung der Meßdaten

Die statistischen Methoden wurden nach Sachs (111) durchgeführt.

Wenn nicht anders erwähnt, sind die Ergebnisse Mittelwerte ($\bar{x}$) aus 3 - 5 Versuchen. Da die Versuchszahl teilweise unterschiedlich war, wurde nicht die Standardabweichung, sondern der Standardfehler des arithmetischen Mittels (S.E.M.) angegeben.

Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Gruppen von Meßwerten wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und der Korrelationskoeffizient (r) berechnet. Der Korrelationskoeffizient wurde im zweiseitigen Test auf Signifikanz geprüft.

Zur Prüfung von Medianwert-Unterschieden bei mindestens drei Stichproben und mehr wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney (U-Test) angewendet, Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zur Klärung der Rolle von Ferritin, dem Eisenspeicherprotein des Organismus, bei der Eisenresorption, wurde die Kinetik der ^{59}Fe -Aufnahme von zwei- und dreiwertigen ^{59}Fe -Derivaten, sowie deren Utilisation zur Bildung von Hämoglobin an normalen und eisenarmen Ratten untersucht. Der Gehalt an Ferritin von Mukosa- und Lebergewebe, sowie der ^{59}Fe -Einbau in das Ferritin von Leber- und Duodenalmukosa wurde 0,5; 2,5; 6 und 28 h nach der ^{59}Fe -Gabe gemessen. Dazu war es zunächst notwendig eine empfindliche, speziesspezifische Bestimmungsmethode für Ferritin zu erstellen.

Wir entwickelten dafür einen Radioimmunoassay für Rattenferritin dessen Empfindlichkeit bis zu 0,5 $\mu\text{g/g}$ Gewebefeuchtgewicht bzw. 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Plasma betrug. Zur Bestimmung der ^{59}Fe -Inkorporation in Ferritin wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Die ^{59}Fe -Resorption der Eisenderivate wurde durch Messung der ^{59}Fe -Retention im Ganzkörperzähler ermittelt, der ^{59}Fe -Einbau in Hämoglobin durch Abtrennung des ^{59}Fe -Häms von Globin mit Phosphorsäure als Dissoziationsmittel und Cyclohexanon als organische Phase.

2. Bei eisenarmen Tieren war die ^{59}Fe -Retention im Vergleich zu den Kontrolltieren im Mittel um 14 - 28% höher und der ^{59}Fe -Lebergehalt um 50%. Die Eisensalze $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ zeigten untereinander sehr ähnliche Werte. Das Eisen aus dem Eisenpolymaltosekomplex hingegen wird langsamer aufgenommen und erreicht am Ende der Versuchszeit nach 28 h bei den eisenarmen Tieren einen 20% niedrigeren Retentionswert, die Kontrolltiere erreichen in etwa dieselben Werte wie die Eisensalze.

3. Bei den Kontrolltieren ergibt sich ein Unterschied in der Utilisation von $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ und $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ zur Hämoglobinsynthese; die ^{59}Fe -Werte im Hämoglobin nach Gabe des Eisenpolymaltosekomplexes lagen unbedeutend niedriger. Der Einbau von ^{59}Fe ist im Hämoglobin bei eisenarmen Tieren nach 28 h um 90% höher als bei den Kontrolltieren. Wobei der Verlauf des ^{59}Fe -Einbaus ins Hämoglobin eisenarmer Tiere einen unwesentlichen Unterschied zwischen dem dreiwertigen und zweiwertigen Eisensalz ergab. Die Werte des Eisenpolymaltosekomplexes lagen nach 28 h um 45% niedriger als die des $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$.
4. Der ^{59}Fe -Gehalt der Duodenalmukosa zeigte ein anderes Bild als das des Lebergewebes; die in der Mukosa retinierte ^{59}Fe -Menge eisenarmer Tiere betrug nur 1/3 des Wertes der normalen Tiere.
Es gab weder bei der Mukosa noch bei der Leber einen Unterschied des ^{59}Fe -Gewebegehaltes der Tiere, unabhängig davon, ob sie $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ oder $^{59}\text{Fe-FeSO}_4$ erhielten. Im Gegensatz dazu wurde das ^{59}Fe aus dem Eisenpolymaltosekomplex bei normalen Tieren um 77%, bei eisenarmen Tieren um 65% niedriger eingebaut, wenn man die $^{59}\text{Fe-FeCl}_3$ -Werte 100% gleichsetzt.
5. Der Ferritingehalt in Mukosa- und Lebergeweben stand im direkten Verhältnis zum Eisenstatus der Tiere

Leberferritin:

eisenarme Tiere	4 µg/g Gewebefeuchtgewicht
normale Tiere	210 µg/g Gewebefeuchtgewicht

Mukosaferritin:

eisenarme Tiere	2,6 µg/g Gewebefeuchtgewicht
normale Tiere	10,9 µg/g Gewebefeuchtgewicht

6. Im Eisenmangel war der Ferritingehalt der Leber herabgesetzt, der ^{59}Fe -Gehalt der Leber jedoch erhöht; der prozentuale Anteil des eingebauten ^{59}Fe in Ferritin ($\text{ng } ^{59}\text{Fe}/\mu\text{g Ferritin}$) war bei eisenarmen Tieren achtmal höher. Im Gegensatz zur Leber war in der Duodenalmukosa eisenarmer Tiere der Gehalt an $^{59}\text{Fe}/\text{Mukosaferritin}$ ($\text{ng } ^{59}\text{Fe}/\mu\text{g Ferritin}$) im Durchschnitt fünfmal niedriger als bei den Kontrollen der Tiere, die Eisensalze bekamen; bei den Kontrolltieren, die Eisenpolymaltose erhielten, lagen die Werte um das zweifache niedriger.
7. Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, daß dem Mukosaferritin eine andere Rolle zukommt, als dem Leberferritin. Das Mukosaferritin übt neben dem Transferrin eine regulative Funktion auf die Eisenresorption aus, wobei dem Leberferritin hauptsächlich die Eisenspeicherfunktion zugeordnet scheint. Als Konsequenz dieser Untersuchung könnte Ferritin als "Überlauf"-Protein betrachtet werden, das im Normalzustand überschüssiges Eisen vom Transfer zum Blut abfängt. Im Eisenmangelzustand dagegen, ist der erhöhte Eisenbedarf des Organismus, durch einen bisher noch nicht bekannten Mechanismus, zu einem schnelleren Transfer durch die Mukosazelle befähigt. Wobei mit Hilfe des schnelleren Durchsatzes durch die Mukosazelle weniger Eisen in Ferritin eingebaut wird.

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- (1) Harrison P.M., Hoy T.G., Macara I.G. and Hoare R.J.
Ferritin Iron Uptake and Release
Biochem.J. 143 : 445 - 451 (1974)
- (2) Arosio P., Adelman T.G. and Drysdale J.W.
On Ferritin Heterogeneity
J. Biol. Chem. 253 : 4451 - 4458 (1978)
- (3) Hübers H., Hübers E., Rummel W., Crichton R.R.
Isolation and Characterization of Iron-Binding Proteins from
Rat Intestinal Mucosa
Eur. J. Biochem. 66 : 447 - 455 (1976)
- (4) Gel Filtration, Theory and Practice
Firmenschrift Fa. Pharmacia Uppsala, Schweden 1979
- (5) Laurent T.C., Killander J.
A Theory of Gel Filtration and its Experimental Verification
J. Chromatogr. 14 : 317 - 330 (1964)
- (6) Minden P., Farr R.S., Trembath J.
Some Variable Controls for Accurate Heterologous Anti-
Immunoglobulin (HAI) Tests
Immunochem. 12 : 477 - 479 (1975)
- (7) Gabriel O.
Analytical Disc Gel Electrophoresis
Meth. Enzym. 22 : 565 - 578 (1971)
- (8) Weber K., Osborn M.
The Reliability of Molecular Weight Determinations by
Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
J. Biol. Chem. 224 : 4406 - 4412 (1966)

- (9) Shapiro A.L., Vinuela E., Maizel B.V. jr.
Molecular Weight Estimation of Polypeptide Chains by
Electrophoresis in SDS-Polyacrylamide Gels
Biochim. Biophys. Res. Commun. 28 : 815 - 820 (1967)
- (10) Weber K.
New Structural Model of E. Coli Aspartate Transcarbamylase
and the Amino-acid Sequence of the Regulatory Polypeptide Chain
Nature, 218 : 1116 - 1119 (1968)
- (11) Laemmli U.K.
Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the
Head of Bacteriophage T4
Nature, 227 : 680 - 685 (1970)
- (12) Whitaker J.R.
Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration
on Sephadex
Anal. Chem. 35 : 1950 - 1953 (1963)
- (13) Andrews P.
The Gel Filtration Behaviour of Proteins Related to their
Molecular Weight over a Wide Range
Biochem. J. 96 : 595 - 606 (1965)
- (14) LKB Application Note 219, Apr. 1976
Preparative Electrofocusing in Density Gradients
- (15) Haglung H.
in Science Tools 14 : 17 - 23 (1967) Firmenschrift von Pharmacia
- (16) LKB Application Note 194, Aug. 1975
High Speed Electrofocusing with the LKB 8100 Ampholine
Electrofocusing Columns Using Constant Power
- (17) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J.
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193 : 265 - 275 (1951)

- (18) Worwood M.
Serum Ferritin
in Methods in Haematology Vol I, ed. J. Cook pp 59 - 89
Churchill - Livingstone, New York
- (19) Worwood M. et al
International Committee for Standardization in Haematology
(Expert Panel on Iron)
Preparation, Characterization and Storage of Human Ferritin
for Use as a Standard for the Assay of Serum Ferritin
Clin. Lab. Haemat. 6 : 177 - 191 (1984)
- (20) Hawkes R., Niday E. and Gordon J.
A Dot-Immunobinding Assay for Monoclonal and Other Antibodies
Anal. Biochem. 119 : 142 - 147 (1982)
- (21) Ouchterlony Ö., Nilsson L.-Å
Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1 :
Immunochemistry (ed. D.M. Weir) 3rd ed.: 19.1. - 19.44 (1979)
- (22) Everhardt D.L., Shefner A.M.
Specificity of Fish Antibody
J. Immunol. 97 : 231 - 234 (1966)
- (23) Nowotny A.M., Thomas S., Duron O.S.
Relation of Structure to Function in Bacterial O Antigens
J. Bacteriol. 85 : 418 - 422 (1963)
- (24) Laurell C.B.
Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in
Agarose Gel Containing Antibodies
Anal. Biochem. 15 : 45 - 52 (1966)
- (25) Carmal N., Konijn A.M.
Quantitative Determination of Ferritin by Electroimmunoassay
Anal. Biochem. 85 : 499 - 505 (1978)

- (26) Grabar P., Williams C.A.
Methode perinettant l'étude conjuguée des propriétés
électrophoretiques et immunochimiques d'un mélange de protéins.
Application au sérum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10 : 193 - 197 (1953)
- (27) Briegleb L., Ehrlich P.
Beiträge zur Kenntnis der Milch immunisierter Tiere
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 13 : 336 - 338 (1893)
- (28) Hudson L., Hay F.L.
Practical Immunology, 2nd ed, Blackwell Scientif. Public.
pp 1 - 2 (1980)
- (29) Kronvall G., Seal U.S., Finstad J., Williams R.C.
Phylogenetic Insight into Evolution of Mammalian F_C-Fragment
of γ G Globulin using Staphylococcal Protein A.
J. Immunol. 104 : 140 - 145 (1970)
- (30) Hjelm H., Hjelm K., Sjöquist J.
Protein A from Staphylococcus aureus. Its Isolation by Affinity
Chromatography and its Use as an Immunoabsorbent for Isolation
of Immunoglobulins.
FEBS Lett. 28 : 73 - 76 (1972)
- (31) Mancini G., Carbonara A.O., Herlmanns J.F.
Immunochemical Quantitation of Antigens by Single Radial
Immunodiffusion.
Immunochem. 2 : 235 - 254 (1965)
- (32) Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S.
The Preparation of ¹³¹I-Labelled Human Growth Hormone of
High Specific Radioactivity.
Biochem. J. 89 : 114 - 119 (1963)
- (33) Bolton A.E., Lee-Own V., Kramer McLean R., Challand G.S.
Three Different Radioiodination Methods for Human Spleen Ferritin Compared
Clin. Chem. 25/10 : 1826 - 1830 (1979)

- (34) Deppe W.M., Joubert S.M., Naidoo P.
Radioimmunoassay of Serum Ferritin
J. Clin. Path. 31 : 872 - 877 (1978)
- (35) Fraker P.J., Speck J.C.
Protein and Cell Membran Iodination with a Sparingly Soluble
Chloramide 1,3,4,6-Tetrachloro -3a, 6a-Diphenylglycoluril
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80 : 849 - 857 (1978)
- (36) Johnstone A., Thorpe R.
Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientif.Public.
pp 103 - 104 (ed, 1982)
- (37) Luxton A.W., Walker W.H.C., Gouldie J., Ali M.A.M., Pelletier C.
A Radioimmunoassay for Serum Ferritin
Clin. Chem. 23/4 : 683 - 689 (1977)
- (38) Barnett M.D., Gordon Y.B., Amess J.A.L., Mellin D.L.
Measurement of Ferritin in Serum by Radioimmunoassay
J. Clin. Pathol. 31 : 742 - 748 (1978)
- (39) Linder M.C., Munro H.N.
Assay of Tissue Ferritin
Anal. Biochem. 48 : 266 - 278 (1972)
- (40) Teale F.W.J.
Cleavage of the Heam-protein link by Acid Methylethylketone
Biochim. Biophys. Acta 35 : 543 (1959)
- (41) Ward C. et al
Correlation of Serum Ferritin and Liver Ferritin Iron in the
Anemic, Normal and Iron-loaded Rat.
Am. J. Clin. Nutr. 30 : 1054 - 1063 (1977)
- (42) Herbert W.J.
Handbook of Experimental Immunology, Vol. 3 (3rd.ed.)
Application of Immunological Methods (ed. D.M. Weir)
Blackwell Scientif. Public. A3, 1-A3, 15.

- (43) Brewer J.M., Pesce A.J., Ashworth R.B.
Experimentelle Methoden in der Biochemie (Übers.: P.Pfänder)
G. Fischer Verlag (1977)
- (44) Forth W., Andres H.
Methode zur Erzeugung eines Eisenmangels bei Ratten
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19 : 363 - 364 (1969)
- (45) Sharpe L.M., Culbreth G.C., Klein R.J.
Blood and Packed Cell Volume of the Adult Rat as Measured
by Tagged Cells.
Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 74 : 681 - 685 (1950)
- (46) Belcher E.H., Harriss E.B.
Studies of Plasma Volume, Red Cell Volume and Total Blood
Volume in Young Growing Rats.
J. Physiol. 139 : 64 - 78 (1957)
- (47) Siegel L.M., Monty K.J.
Determination of Molecular Weights and Fractional Ratios of
Proteins in Impure Systems by Use of Gel Filtration and
Density Gradient Centrifugation. Application to Crude Preparations
of Sulfite and Hydroxylamine Reductase.
Biochem. Biophys. Acta 112 : 346 - 362 (1966)
- (48) Harrison P.M.
The Structure of Apoferritin : Molecular Size, Shape and Symetry
from X-Ray Data
J.Mol. Biol. 6 : 404 - 422 (1963)
- (49) Rothen A.
Ferritin and Apoferritin in the Ultracentrifuge
J. Biol. Chem. 152 : 679 - 693 (1944)
- (50) Cooper T.C.
Biochemische Arbeitsmethoden, pp 178 - 221, Berlin-New York:
de Gruyter (1981)

- (51) Savin M., Cook J.D.
Mucosal Iron Transport by Rat Intestine
Blood 56 : 1029 - 1035 (1980)
- (52) Bjorklid E., Helgeland L.
Sex Difference in the Ferritin Content of Rat Liver
Biochim. Biophys. Acta 221 : 583 - 592 (1970)
- (53) Mack U. et al
Regulation of Plasma Ferritin by the Isolated Perfused Rat Liver
Brit. J. Haemat. 47 : 403 - 412 (1981)
- (54) Ekenved G.
Iron Absorption Studies
Scand. J. Haemat. Suppl. 28 : 31 - 49 (1976)
- (55) Linder M.C. et al
Ferritin and Intestinal Iron Absorption : Pancreatic Enzymes
and Free Iron
Am. J. Phys. 228 : 196 - 204 (1975)
- (56) Johnstone A., Thorpe R.
Immunochemistry in Practice
Blackwell Scientific Publication (ed. 1982) pp 242 - 249
- (57) Hudson L., Hay F.C.
Practical Immunology
Blackwell Scientific Publication p 1 (ed. 1980)
- (58) Johnstone A., Thorpe R.
Immunochemistry in Practice
Blackwell Scientific Publication (ed. 1982) pp 247 - 248
- (59) Becker G.
Interaktion von Kobalt und Eisen bei der intestinalen Eisenresorption
Dissertation 1976, Saarbrücken

- (60) McCance R.A., Widdowson E.M.
Absorption and Excretion of Iron
Lancet 1 : 680 - 684 (1937)
- (61) Bothwell T.H., Finch C.A.
Iron Metabolism
Little, Brown & Company, Boston 1962 p 120
- (62) Forth W., Rummel W.
Iron Absorption
Physiol. Reviews 53 (3) : 724 - 792 (1973)
- (63) Linder M.C., Munro H.N.
The Mechanism of Iron Absorption and its Regulation
Fed. Pro. 36 (7) : 217 - 223 (1977)
- (64) Rummel W., Forth W., Andres H.
Zur Frage der metabolischen Abhängigkeit von Eisenbindung-
und durchtritt durch den isolierten Dünndarm
Naun-Schmiedeb. Arch. 260 : 50 - 57 (1968)
- (65) Wheby M.S., Jones L.G., Crosby W.H.
Studies on Iron Absorption, Intestinal Regulatory Mechanism
J.Clin. Invest. 43(7), 1433 - 1442 (1964)
- (66) Forth W., Leopold G., Rummel W.
Eisendurchtritt von der Mukosa - zur Serosaseite und umgekehrt
an isolierten eisenarmen und normalen Segmenten von Jejunum und Ileum
Naun-Schmiedeb. Arch. 261 : 434 - 440 (1968)
- (67) Forth W., Rummel W.
Beziehungen zwischen dem Durchtritt des Eisens durch die Darmwand
und seiner Bindung im Gewebe
Naun-Schmiedeb. Arch. 264 : 230 - 231 (1969)
- (68) Forth W., Rummel W.
in Pharmacology of Intestinal Absorption : Gastrointestinal Absorption
of Drugs. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.
Pergamon, Oxford pp 559 - 746 (1975) (eds. Forth W., Rummel W.)

- (69) Greenberger N.J., Ruppert R.D.
Inhibition of Protein Synthesis:
A Mechanism for the Production of Impaired Iron Absorption
Science 153 : 315 - 316 (1966)
- (70) Greenberger N.J., Ruppert R.D., Cuppage F.E.
Inhibition of Intestinal Iron Transport Induced by Tetracycline
Gastroent. 53 : 590 - 599 (1967)
- (71) Yeh. S.D.J., Shils M.B.
Effect of Tetracycline on Intestinal Absorption of Various
Nutrients by the Rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123 : 367 - 375 (1966)
- (72) Thomas F.B., Baba N., Greenberger N.J., Salsbury D.
Effect of Phenobarbital on Small Intestinal Structure and
Function in the Rat.
J.lab. Clin. Med. 80 : 548 - 558 (1972)
- (73) Hübers H., Hübers E., Forth W., Rummel W.
Binding of Iron to a Non-Ferritin Protein in the Mucosal
Cells of Normal and Iron Deficient Rats During Absorption
Life Sci. 10 (1) : 1141 - 1148 (1971)
- (74) Batey R.G., Gallagher N.D.
Study of the Subcellular Localization of ^{59}Fe and Iron-
Binding Proteins in the Duodenal Mucosa of Pregnant and
Nonpregnant Rats.
Gastroent. 73 (2) : 267 - 272 (1977)
- (75) Hahn P.F., Bale W.F., Ross J.F., Balfour W.M., Whipple G.H.
Radioactive Iron Absorption by Gastric Intestinal Tract
J. Exptl. Med. 78 : 169 - 188 (1943)
- (76) Granick S.
Iron Metabolism and Hemochromatosis
Bull. N.Y. Acad. Med. 25 : 403 - 428 (1949)

- (77) Brittin G.M., Raval D.
Duodenal Ferritin Synthesis during Iron Absorption in the
Iron-Deficient Rat
J. Lab. Clin. Med. 75 : 811 - 817 (1970)
- (78) Bielig H.J., Bayer E.
Synthetisches Ferritin, ein Eisen (III)-Komplex des Apoferritins
Naturwiss. 42 : 125 - 126 (1955)
- (79) Bielig H.J., Bayer E.
Eisenaustausch zwischen Proteinen, Modellversuche zur Eisenresorption
Naturwiss. 42 : 466 (1955)
- (80) Becker G., Korpilla-Schäfer S., Osterloh K., Forth W.
Capacity of the Mucosal Transfer System and Absorption of
Iron after Oral Administration in Rats.
Blut 38 : 127 - 134 (1979)
- (81) Vuljimiri A. et al
Size and Charge Heterogeneity of Rat Tissue Ferritins
Biochim. Biophys. Acta 412 : 148 - 156 (1975)
- (82) Drysdale J.W., Munro H.N.
Regulation of Synthesis and Turnover of Ferritin in Rat Liver
J. Biol. Chem. 241 : 3630 - 3637 (1966)
- (83) Drysdale J.W.
in " Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry
and Medicine " ed. by R.R. Crichton, North Holland/Amsterdam
pp 359 - 366 (1975)
- (84) Drysdale J.W.
in " Iron Metabolism " Ciba Foundation Symposium 51 pp 41 - 57
Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland/Amsterdam (1977)
- (85) Worwood M et al
Preparation, Characterization and Storage of Human Ferritin
for Use as a Standard for the Serum Ferritin
Clin. Lab. Haemat. 6 : 177 - 191 (1984)

- (86) Forth W., Rummel W., Pfleger K., Seifen E., Sp.I.Richmond
Der Einfluß verschiedener Liganden auf Resorption, Verteilung
und Ausscheidung von Eisen nach oraler Verabfolgung
Naunyn-Schmiedeberg. Arch. 252 : 242 - 257 (1965)
- (87) Christopher J. et al
in " Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry
and Medicine " ed. R.R. Crichton pp 411 - 416 (1975)
- (88) Prieto J., Barry M., Sherlock J.
Serum Ferritin in Patients with Iron Overload and with Acute
and Chronic Liver Diseases
Gastroenter. 68 : 525 - 530 (1975)
- (89) Hegenauer J., Saltman P.
Bioavailable Copper and Iron in Rat Diets.
Am. J. Clin. Nutr. 29 : 936 - 941 (1976)
- (90) Lahey M.E. et al
Studies on Copper Metabolism II. Haematologic Manifestations
of Copper Deficiency in Swine
Blood 7 : 1053 - 1060 (1952)
- (91) Finch C.A. et al
Ferrokinetics in Man
Medicine 49 : 17 - 53 (1979)
- (92) Larsen L., Milman N.
Normal Iron Absorption Determined by Means of Whole Body
Counting and Red Cell Incorporation of ⁵⁹Fe
Acta Med. Scandinav. 198 : 271 - 274 (1975)
- (93) McCance R.A., Widdowson E.M
Absorption and Excretion of Iron
Lancet 1 : 680 - 684 (1937)
- (94) Schäfer S., Forth W.
On the Absorption of Divalent and Trivalent Iron in Living Rats
Drug Res. (II), 11 : 1570 - 1569 (1984)

- (95) Geisser P., Müller A.
Iron Pharmacokinetics after Administration of Ferric-Hydroxide-
Polymaltose Complex in Rats
Drug Res. 34 (11) : 1560 - 1569 (1984)
- (96) Forth W.
in : Handbuch der Inneren Medizin Bd. III/3A. Dünndarm
Hrsg. W.F. Caspary pp. 267 - 297 Springer, Berlin-Heidelberg-
New York (1983)
- (97) Dawson R.B., Rafal S., Weintraub L.
Absorption of Hemoglobin Iron : The Role of Xanthine Oxidase
in the Intestinal Heme-Splitting Reaction
Blood 35 : 94 - 103 (1970)
- (98) Morgan B.H.
Factors Affecting the Synthesis of Transferrin by Rat Tissue Slices
J. Biol. Chem. 244 : 4193 - 4199 (1969)
- (99) Morton A.G., Tavill A.S.
Studies on the Mechanism of Iron Supply in the Regulation of
Hepatic Transferrin Synthesis
in : Proteins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and
Medicine (ed. R.R. Crichton, North-Holland/American elsevier
pp 167 - 171 (1975))
- (100) Balcerzak S.P., Greenberger N.J.
Iron Content of Isolated Intestinal Epithelial Cells in
Relation to Iron Absorption
Nature 220 : 270 - 271 (1968)
- (101) Pollack S., Campana T.
The Relationship between Mucosal Iron and Iron Absorption in
the Guinea Pig
Scandinav. J. Haemat. 7 : 208 - 211 (1970)

- (102) Cumming R.L.C. et al
The Relationship between Body Iron Stores and Ferritin
Turnover in Rat Liver and Intestinal Mucosa
Br. J. Haematol. 18 : 653 - 658 (1970)
- (103) Worwood M., Jacobs A.
The Subcellular Distribution of ^{59}Fe in Small Intestinal Mucosa :
Studies with Normal, Iron Deficient and Iron Overloaded Rats
Br. J. Haematol. 22 : 265 - 272 (1972)
- (104) Bernier G.M., Schade G.S., Conrad M.E.
Ferritin Production in the Rat Small Intestine
Br. J. Haematol. 19 : 361 - 370 (1970)
- (105) Marx J.J.M.
Mucosal Uptake, Mucosal Transfer and Retention of Iron,
Measured by Whole-Body Counting
Scand. J. Haematol. 23 : 293 - 302 (1979)
- (106) Smith M.D., Pannacciuli I.M.
Absorption of Inorganic Iron from Graded Doses : its Significance
in Relation to Iron Absorption Tests and the " Mucosal Block "
Theory
Br. J. Haematol. 4 : 428 - 431 (1958)
- (107) Wöhler F., Heilmeyer L., Emrich D., Kang S.H.
Zur Funktion des Ferritins bei der Eisenresorption
Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. 230 : 107 - 124 (1957)
- (108) Hiyeda K.
The Cause of Kashin Beck's Disease
Japan. J. Med. Sci. 4 : 91 - 106 (1939)
- (109) Worwood M., Jacobs A.
The Subcellular Distribution of Orally Administered ^{59}Fe in
Rat Small Intestinal Mucosa
Br. J. Haematol. 20 : 587 - 597 (1971)

- (110) Hoy T.G., Harrison P.
The Uptake of Ferric Iron by Rat Liver Ferritin in Vivo and in Vitro
Br. J. Haematol. 33 : 497 - 504 (1976)
- (111) Sachs L.
Angewandte Statistik
Springer, Berlin-Heidelberg- New York (1974)
- (112) Speyer E.B., Fielding J.
Ferritin as a Cytosol Iron Transport Intermediate in Human Reticulocytes
Br. J. Haematol. 42 : 255 - 267 (1979)
- (113) Cook J.D., Lipschitz D.A., Skikne B.S.
Absorption of Controlled-Release Iron
Clin. Pharmac. Therapy 32 : 531 - 539 (1982)
- (114) Cook J.D., Morck T.A., Lynch S.R.
The Inhibitory Effect of Soy Products on Non-Heme Iron Absorption in Man
Am. J.Clin. Nutr. 34 : 2622 - 2629 (1981)
- (115) Morck T.A., Lynch S.R., Cook J.D.
Inhibition of Food Iron Absorption by Coffee
Am. J.Clin. Nutr. 37 : 416 - 420 (1983)
- (116) Majuri R., Konvoneu I., Grasbeck R.
in " Protides of the Biological Fluids " ed. Peeters H., Pergamon Press, Oxford pp 229 - 232 (1984)
- (117) Johnson G., Jacobs P., Purve L.R.
Iron Binding Proteins of Iron-absorbing Rat Intestinal Mucosa
J. Clin. Invest. 71 : 1467 - 1476 (1983)
- (118) Charlton R.W., Jacobs P., Torrance J.D., Bothwell T.H.
The Role of the Intestinal Mucosa in Iron Absorption
J. Clin. Invest. 44 : 543 - 554 (1965)

- (119) Thomson A.B.R., Valberg L.S.
Kinetics of Intestinal Iron Absorption in the Rat : Effect of Cobalt
Am. J. Physiol. 220 : 1080 - 1085 (1971)
- (120) Wheby M.S., Crosby W.H.
The Gastrointestinal Tract and Iron Absorption
Blood 22 : 416 - 428 (1963)
- (121) Nathanson M.H., Muir A., McLaren G.D.
Iron Absorption in Normal and Iron-Deficient Beagle Dogs:
Mucosal Iron Kinetics
Am. J. Physiol. 249 (Gastrointest. Liver Physiol. 12) :
G 439 - G 448 (1985)
- (122) Worwood M., Jacobs A.
Absorption of ^{59}Fe in the Rat : " Iron Binding Substance in the
Soluble Fraction of Intestinal Mucosa "
Life Sci. 10 (1) : 1363 - 1373 (1971)
- (123) El-Shobaki F.A., Rummel W. (1977)
Mucosal Transferrin and Ferritin Factors in the Regulation of
Iron Absorption
Res. exp. Med. 171 : 243 - 253 (1977)
- (124) Banyard S.H., Stammers d.K., Harrison P.M.
Nature, Lond. 271 : 282 - 284 (1978)
- (125) Golberg L., Martin L.E.
Iron containing haematinics. In : Laurence D.R., Bacharach A.L. (eds)
Evaluation in drug activities : Pharmacometrics, Vol II
Academic Press, London-New York pp 535 - 582
- (126) Forth W., Schneider W.
Zur Streitfrage der Verwertbarkeit zwei- und dreiwertigen Eisens
Med. Klin. 80 : 697 - 699 (Nr. 24) (1985)

(127) Worwood M.

"Serum Ferritin" in "Iron Biochemistry and Medicine, II"
eds. Jacobs A., Worwood M. p 237 (1980),
Academic Press, London

(128) Erni L., Oswald N., Rich H.W. und Schneider W.

Chemical Characterization of Iron(III)-Hydroxide-Dextrin Complexes
Drug. Res. 34(II) Nr. II, 1555 - 1559 (1984)

H. TABELLENANHANG

Tabelle A2:
⁵⁹Fe-Einbau in duodenales Mikrosferritin (µg ⁵⁹Fe/µg Ferritin) eisenarmer (a) und
normaler (n) Ratten in Abhängigkeit zur Zeit. M ± SDM (n = 5)

	FeCl ₃				FeSO ₄				Fe-PM			
	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28
n	0,638 ± 0,269	0,921 ± 0,165	0,214 ± 0,044	0,061 ± 0,021	0,630 ± 0,223	0,354 ± 0,033	0,212 ± 0,092	0,021 ± 0,004	0,109 ± 0,060	0,153 ± 0,086	0,067 ± 0,035	0,020 ± 0,004
a	0,186 ± 0,031	0,080 ± 0,020	0,044 ± 0,008	0,031 ± 0,009	0,145 ± 0,032	0,098 ± 0,016	0,064 ± 0,005	0,022 ± 0,002	0,026 ± 0,009	0,034 ± 0,007	0,067 ± 0,023	0,029 ± 0,001

Tab. 11c A.1:

⁵⁹Fe-Aufnahme in die Duodenalinkosa eisenarmer (a) und normaler (n) Ratten, sowie der ⁵⁹Fe-Ferritgehalt pro g Gewebefeuchtigkeit, $M \pm SEM$ (n = 5)

	$FeCl_3$				$FeSO_4$				$Fe-PM$			
	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28
n												
μg Fe/g	13,7	15,3	6,41	2,68	14,4	7,94	5,59	0,757	1,92	3,30	1,41	1,79
Feuchtgewicht	$\pm 0,1$	$\pm 5,4$	$\pm 1,6$	$\pm 1,70$	$\pm 3,9$	$\pm 1,19$	$\pm 0,95$	$\pm 0,95$	$\pm 0,050$	$\pm 0,69$	$\pm 0,64$	$\pm 1,40$
μg ⁵⁹ Fe-Ferrit-	6,23	12,15	3,25	0,408	4,35	4,10	2,99	0,194	1,011	3,18	0,618	0,164
tin/g Feuchtgew.	$\pm 1,25$	$\pm 3,42$	$\pm 0,39$	$\pm 0,105$	$\pm 0,42$	$\pm 0,109$	$\pm 0,935$	$\pm 0,061$	$\pm 0,250$	$\pm 0,96$	$\pm 0,198$	$\pm 0,037$
a												
μg Fe/g	5,33	1,95	1,21	0,49	4,54	3,88	1,37	0,482	0,981	0,623	0,945	0,510
Feuchtgewicht	$\pm 1,26$	$\pm 0,61$	$\pm 0,16$	$\pm 0,075$	$\pm 1,40$	$\pm 0,62$	$\pm 0,31$	$\pm 0,035$	$\pm 0,380$	$\pm 0,064$	$\pm 0,436$	$\pm 0,016$
μg ⁵⁹ Fe-Ferrit-	0,369	0,186	0,120	0,073	0,280	0,373	0,183	0,049	0,062	0,106	0,209	0,062
tin/g Feuchtgew.	$\pm 0,015$	$\pm 0,013$	$\pm 0,007$	$\pm 0,015$	$\pm 0,017$	$\pm 0,014$	$\pm 0,007$	$\pm 0,007$	$\pm 0,008$	$\pm 0,006$	$\pm 0,024$	$\pm 0,009$

Tabelle A4:

^{59}Fe -Aufnahme in das Lebergewebe eisenarmer (a) und normaler (n) Ratten, sowie der ^{59}Fe -Ferritgingehalt pro g Gewebefeuchtgewicht. $M \pm \text{SEM}$ ($n = 5$)

	FeCl_3			FeSO_4			Fe-PM		
	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	h
$\mu\text{g Fe/g Feuchtgew.}$	0,109 $\pm 0,026$	0,238 $\pm 0,106$	0,294 $\pm 0,057$	0,236 $\pm 0,028$	0,105 $\pm 0,0345$	0,288 $\pm 0,067$	0,280 $\pm 0,037$	0,233 $\pm 0,0406$	0,011 $\pm 0,00256$
$\mu\text{g } ^{59}\text{Fe-Ferrit-tingew.}$	0,032 $\pm 0,0098$	0,114 $\pm 0,026$	0,173 $\pm 0,038$	0,183 $\pm 0,052$	0,042 $\pm 0,016$	0,157 $\pm 0,031$	0,226 $\pm 0,027$	0,227 $\pm 0,050$	0,009 $\pm 0,004$
$\mu\text{g Fe/g Feuchtgew.}$	0,264 $\pm 0,0239$	0,498 $\pm 0,0393$	0,542 $\pm 0,0149$	0,413 $\pm 0,0456$	0,269 $\pm 0,0416$	0,587 $\pm 0,0148$	0,442 $\pm 0,0249$	0,460 $\pm 0,0257$	0,0402 $\pm 0,0198$
$\mu\text{g } ^{59}\text{Fe-Ferrit-tingew.}$	0,010 $\pm 0,0004$	0,017 $\pm 0,0032$	0,034 $\pm 0,0060$	0,0189 $\pm 0,0061$	0,018 $\pm 0,0061$	0,043 $\pm 0,0039$	0,048 $\pm 0,0089$	0,016 $\pm 0,0057$	0,0023 $\pm 0,001$
									0,0068 $\pm 0,0013$
									0,013 $\pm 0,0046$
									0,0012

Tabelle A5:
 ^{59}Fe -Einbau in Leberferritin (ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin) eisenarmer (a) und normaler (n)
 Ratten in Abhängigkeit von der Zeit. $M \pm \text{SEM}$ (n = 5)

	FeCl ₂				FeSO ₄				Fe-PM				
	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	h
(a)	0,16 ±0,07	0,691 ±0,0246	0,765 ±0,173	0,815 ±0,240	0,184 ±0,055	1,67 ±0,52	1,32 ±0,32	0,98 ±0,21	0,051 ±0,035	0,235 ±0,078	0,091 ±0,070	0,612 ±0,189	
(n)	4,65 ±1,29	5,65 ±1,07	7,05 ±1,12	6,58 ±1,51	4,58 ±1,36	10,26 ±1,53	8,41 ±1,36	6,18 ±1,90	1,15 ±0,178	1,54 ±0,415	3,99 ±0,97	3,67 ±0,61	

Tabelle A6:
Leberferritinwerte ($\mu\text{g/g w.w.}$) von normalen (n) und eisenarmen (a) Ratten
in Abhängigkeit von der Zeit. $M \pm \text{SEM}$ ($n = 5$)

	FeCl ₃				FeSO ₄				Fe-PM				
	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	h
n	239,1 ± 56,2	209,5 ± 81,8	232,2 ± 29,0	176,0 ± 38,8	214,0 ± 53,6	217,1 ± 76,8	204,7 ± 77,5	182,7 ± 78,1	150,9 ± 44,7	214,2 ± 45,1	233,3 ± 64,9	188,3 ± 58,7	
a	2,32 ± 1,28	3,16 ± 0,68	5,13 ± 3,12	2,79 ± 1,48	4,07 ± 1,25	4,57 ± 1,38	6,20 ± 3,30	3,14 ± 2,89	4,78 ± 1,75	4,77 ± 1,18	3,27 ± 2,8	3,12 ± 1,12	

Tabelle A7:
Mikrosferritinwerte ($\mu\text{g/g w.w.}$) von normalen (n) und eisenarmen Ratten
in Abhängigkeit von der Zeit. $M \pm \text{SEM}$ ($n = 5$)

	FeCl_3				FeSO_4				FE-PM			
	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	h
n	9,85 $\pm 4,60$	13,1 $\pm 6,83$	15,18 $\pm 9,06$	7,58 $\pm 3,49$	6,91 $\pm 1,88$	11,59 $\pm 3,37$	16,8 $\pm 5,45$	9,88 $\pm 2,26$	9,32 $\pm 4,15$	10,41 $\pm 5,13$	9,24 $\pm 5,02$	10,4 $\pm 4,25$
a	1,99 $\pm 0,474$	2,34 $\pm 0,711$	2,73 $\pm 0,950$	2,44 $\pm 0,965$	1,93 $\pm 0,528$	3,82 $\pm 0,884$	2,84 $\pm 1,58$	2,32 $\pm 1,05$	2,41 $\pm 0,916$	3,12 $\pm 0,923$	3,14 $\pm 1,06$	2,15 $\pm 0,715$

Tabelle A8 : ^{59}Fe -Verteilung in Vollblut normaler (n) und eisenarmer (a) Ratten. $M \pm \text{SD}$ ($n = 3 - 5$)

	h	Blut (n) ($\mu\text{g } ^{59}\text{Fe}/\text{ml}$)	Blut (a)
FeCl_3	0,5	0,338 $\pm 0,087$	1,46 $\pm 0,123$
	2,5	0,497 $\pm 0,168$	1,10 $\pm 0,348$
	6	0,239 $\pm 0,105$	0,985 $\pm 0,109$
	28	0,580 $\pm 0,385$	2,42 $\pm 0,249$
FeSO_4	0,5	0,558 $\pm 0,303$	1,46 $\pm 0,425$
	2,5	0,609 $\pm 0,349$	1,25 $\pm 0,224$
	6	0,237 $\pm 0,105$	1,25 $\pm 0,566$
	28	0,593 $\pm 0,204$	2,39 $\pm 0,116$
Fe-PM	0,5	0,069 $\pm 0,056$	0,099 $\pm 0,058$
	2,5	0,240 $\pm 0,134$	0,381 $\pm 0,157$
	6	0,064 $\pm 0,036$	0,305 $\pm 0,204$
	28	0,294 $\pm 0,172$	0,842 $\pm 0,541$

Tabelle 19: ^{59}Fe -Verteilung in Plasma normaler (n) und eisenarmer (a) Ratten. $\bar{M} \pm \text{SD}$ (n = 3 - 5)

h	Plasma (n)	Plasma (a)
	($\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/ml}$)	
FeCl_3	0,5 $\pm 0,076$	1,08 $\pm 0,123$
	2,5 $\pm 0,151$	0,479 $\pm 0,239$
	6 $\pm 0,032$	0,069 $\pm 0,039$
	28 $\pm 0,017$	0,023 $\pm 0,003$
FeSO_4	0,5 $\pm 0,219$	1,25 $\pm 0,404$
	2,5 $\pm 0,204$	0,657 $\pm 0,130$
	6 $\pm 0,019$	0,035 $\pm 0,014$
	28 $\pm 0,002$	0,036 $\pm 0,028$
Fe-PM	0,5 $\pm 0,040$	0,062 $\pm 0,038$
	2,5 $\pm 0,082$	0,179 $\pm 0,100$
	6 $\pm 0,008$	0,045 $\pm 0,028$
	28 $\pm 0,016$	0,007 $\pm 0,004$

Tabelle A10: ^{59}Fe -Verteilung in Blutzellen normaler (n) und eisenarmer (a) Ratten. $M \pm \text{SD}$ ($n = 3 - 5$)

	h	Blutzellen (n)	Blutzellen (a)
		($\mu\text{g } ^{59}\text{Fe}/\text{ml}$)	
FeCl_3	0,5	0,030 $\pm 0,033$	0,296 $\pm 0,201$
	2,5	0,102 $\pm 0,085$	0,490 $\pm 0,154$
	6	0,138 $\pm 0,080$	0,985 $\pm 0,252$
	28	0,569 $\pm 0,389$	1,58 $\pm 0,354$
FeSO_4	0,5	0,043 $\pm 0,043$	0,089 $\pm 0,037$
	2,5	0,132 $\pm 0,075$	0,466 $\pm 0,158$
	6	0,164 $\pm 0,113$	1,05 $\pm 0,544$
	28	0,582 $\pm 0,205$	2,37 $\pm 0,243$
Fe-PM	0,5	0,008 $\pm 0,013$	0,029 $\pm 0,023$
	2,5	0,079 $\pm 0,082$	0,177 $\pm 0,052$
	6	0,043 $\pm 0,023$	0,239 $\pm 0,205$
	28	0,267 $\pm 0,159$	0,804 $\pm 0,553$

Tabelle A11: ^{59}Fe -Einbau in Hämoglobin normaler (n) und eisenarmer (a) Ratten. $\bar{M} \pm \text{SD}$ ($n = 3 - 5$)

	h	^{59}Fe -Häm (n)	^{59}Fe -Häm (a)
		($\mu\text{g } ^{59}\text{Fe}/\text{ml Blut}$)	
FeCl_3	0,5	0,005 $\pm 0,003$	0,099 $\pm 0,089$
	2,5	0,030 $\pm 0,032$	0,266 $\pm 0,169$
	6	0,108 $\pm 0,095$	0,311 $\pm 0,156$
	28	0,125 $\pm 0,103$	1,71 $\pm 0,555$
FeSO_4	0,5	0,009 $\pm 0,006$	0,065 $\pm 0,030$
	2,5	0,067 $\pm 0,035$	0,128 $\pm 0,082$
	6	0,114 $\pm 0,089$	0,436 $\pm 0,289$
	28	0,096 $\pm 0,055$	1,84 $\pm 0,176$
Fe-PM	0,5	0,008 $\pm 0,007$	0,016 $\pm 0,021$
	2,5	0,021 $\pm 0,016$	0,050 $\pm 0,035$
	6	0,061 $\pm 0,077$	0,219 $\pm 0,284$
	28	0,089 $\pm 0,099$	0,811 $\pm 0,509$

Tabelle A12:

Plasmaferritinwerte (ng/ml) normaler (n) und eisenarmer (a) Ratten in Abhängigkeit von der Zeit

M $\pm$ SEM (n = 4 - 5)

	FeCl ₃			FeSO ₄			Fe-PM			
	0,5	2,5	6	28	0,5	2,5	6	28	h	
(n)	56,3 ±12,6	67,9 ±13,8	115,4 ±36,6	54,6 ±12,6	79,4 ±18,9	98,7 ±27,9	92,5 ±36,9	50,8 ±15,4	61,2 ±10,2	65,8 ±21,1 + 5,45
(a)	36,8 ± 8,45	80,6 ±30,9	23,4 ±11,1	75,6 ±10,7	55,2 ±13,5	75,7 ±25,1	84,4 ±16,5	54,3 ±35,7	61,6 ±25,1	56,5 ±13,8 ± 5,50

Tabelle 1:

Statistische Vergleiche der ^{59}Fe -Retentionswerte von Kontrolltieren (n) mit eisenarmen Tieren (a) zu den jeweiligen Versuchszeiten (0,5; 2, 5; 6 und 28 h)

n.s.
*

nicht signifikanter Unterschied
signifikanter Unterschied

0,5 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

0,5 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von eisenarmen Tieren (a)

2,5 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	*	—	*
Fe-IM	*	*	—

2,5 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von eisenarmen Tieren (a)

6 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

6 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von eisenarmen Tieren (a)

28 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	n.s.	—	n.s.
Fe-IM	*	*	—

28 h ^{59}Fe -Retentionswerte
von eisenarmen Tieren (a)

Tabelle II:

Statistische Vergleiche der ^{59}Fe -Gehalte der Duodenalmukosa pro g Gasebefuchgewicht von Kontrolltieren (n) mit eisenarmen Tieren (a) zu den jeweiligen Versuchszeiten (0,5; 2,5; 6 und 28 h)

n.s. nicht signifikanter Unterschied

* signifikanter Unterschied

0,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

0,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisenarmen Tieren (a)

2,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

2,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisenarmen Tieren (a)

6 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	*	—	*
Fe-IM	*	*	—

6 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisenarmen Tieren (a)

28 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

28 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisenarmen Tieren (a)

Tabelle III:

Statistische Vergleiche der ^{59}Fe -Ferritineisenmengen der Duodenalmukosa pro g Gewebefeuchtgewicht von Kontrolltieren (n) mit eisenarmen Tieren (a) zu den jeweiligen Versuchszeiten (0,5; 2,5; 6 und 28 h)

n.s. nicht signifikanter Unterschied
* signifikanter Unterschied

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
0,5 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
0,5 h Wert der eisenarmen Tiere (a)

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
2,5 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	*	—	*
Fe-IM	*	*	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
2,5 h Wert der eisenarmen Tiere (a)

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
6 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
6 h Wert eisenarmer Tiere (a)

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
28 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	n.s.	—	n.s.
Fe-IM	n.s.	n.s.	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
28 h Wert eisenarmer Tiere

Tabelle IV:

Statistische Vergleiche der ^{59}Fe -Menge pro μg Ferritin der
Duodenalmukosa von Kontrolltieren (n) mit eisernen Tieren (a)
zu den jeweiligen Versuchszeiten (0,5; 2,5; 6 und 28 h)

n.s. nicht signifikanter Unterschied
* signifikanter Unterschied

0,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

0,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren (a)

2,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	*	—	*
Fe-IM	*	*	—

2,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren

6 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	n.s.	n.s.	—

6 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren (a)

28 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	n.s.	—	n.s.
Fe-IM	n.s.	n.s.	—

28 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren (a)

Tabelle V:

Statistische Vergleiche der ^{59}Fe -Gehalte der Leber pro g Gewebe-
feuchtgewicht von Kontrolltieren (n) mit eisernen Tieren (n)
zu den jeweiligen Versuchszeiten (0,5; 2,5; 6 und 28 h)

n.s. nicht signifikanter Unterschied
* signifikanter Unterschied

0,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

0,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisernen Tieren (n)

2,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

2,5 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisernen Tieren (n)

6 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	*	—	*
Fe-IM	*	*	—

6 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisernen Tieren

28 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

28 h $\mu\text{g } ^{59}\text{Fe/g w.w.}$
von eisernen Tieren

Tabelle VI:

Statistische Vergleiche der ^{59}Fe -Ferritineisenmengen der Lebern pro g Gewebefeuchtgewicht von Kontrolltieren (n) und eisenarmen Tieren (a) zu den jeweiligen Versuchszeiten (0,5; 2,5; 6 und 28 h)

n.s. nicht signifikanter Unterschied
* signifikanter Unterschied

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
0,5 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	n.s.	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
0,5 h Wert der eisenarmen Tiere (a)

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
2,5 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	*	—	*
Fe-IM	*	*	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
2,5 h Wert der eisenarmen Tiere (a)

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
6 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
6 h Wert der eisenarmen Tiere (a)

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
28 h Wert der Kontrolltiere (n)

	FeCl_3	Fe-IM	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	n.s.	n.s.	—

ng ^{59}Fe -Ferritineisen/g w.w.
28 h Wert der eisenarmen Tiere (a)

Tabelle VII:

Statistische Vergleiche der ^{59}Fe -Menge pro μg Ferritin der Leber von Kontrolltieren (n) mit eisernen Tieren (a) zu den jeweiligen Versuchszeiten (0,5; 2,5; 6 und 28 h)

n.s.

nicht signifikanter Unterschied

*

signifikanter Unterschied

0,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	*	*	—

0,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren (a)

2,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	*	—	n.s.
Fe-IM	n.s.	n.s.	—

2,5 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren (a)

6 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	*
FeSO_4	n.s.	—	*
Fe-IM	n.s.	*	—

6 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren (a)

28 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von Kontrolltieren (n)

	FeCl_3	FeSO_4	Fe-IM
FeCl_3	—	n.s.	n.s.
FeSO_4	n.s.	—	n.s.
Fe-IM	n.s.	n.s.	—

28 h ng $^{59}\text{Fe}/\mu\text{g}$ Ferritin
von eisernen Tieren

I. LEBENS LAUF

- 23.1.1954 geboren in Teheran/Iran
Vater : Reza Ehtechami
Mutter: Monir Ehtechami geb. BourBour
- 1960 - 1966 Volksschule in München
- 1966 - 1972 Realschule in München (Herrmann-Frieb Realschule)
- 1972 - 1975 Gymnasium in München (Albert-Einstein Gymnasium)
- 1975 Abitur
- 1976 - 1979 Studium der Pharmazie (Ludwig-Maximilians Universität München)
- 1979 - 1980 Pharmaziepraktikum: Pharmazeutische Prüfung 27.2.1981
- 1981 - 1986 Doktorarbeit am Walther-Straub-Institut für
Pharmakologie und Toxikologie München

